

# **Mikrobielle Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd. Prozessentwicklung, Optimierung und Aufarbeitung**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christoph Ulmer  
aus Tübingen

1. Referent:  
2. Referentin oder Referent:  
eingereicht am:  
mündliche Prüfung (Disputation) am:

apl. Professor Dr. Siegmund Lang  
Professor Dr. An-Ping Zeng  
19.06.2008  
29.08.2008

Druckjahr 2009

## **VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **PUBLIKATIONEN**

Ulmer, C., & Zeng, A.-P. Microbial production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol bioconversion. Chemical & Biochemical Engineering Quarterly 21: 321-326 (2007).

Ulmer, C., Deckwer, W.-D. & Zeng, A.-P. Zweistufiger Prozess zur Herstellung von 1,3-Propandiol und 3-Hydroxypropionaldehyde aus Glycerin. Chemie Ingenieur Technik (74): 674 (2002).

## **TAGUNGSBEITRÄGE**

Ulmer, C. & Zeng, A.-P.: Production and downstream processing of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol bioconversion. (Vortrag). DECHEMA/GVC Vortrags- und Diskussionstagung, Osnabrück (2007).

Ulmer, C. & Zeng, A.-P.: Microbial production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. (Poster). Bioprospectives in Focus: From  $\mu$ l to m<sup>3</sup>, Hamburg (2006).

Ulmer, C., Deckwer, W.-D. & Zeng, A.-P.: Two-stage process for the production of 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. (Poster). DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden (2002).

## **DANKSAGUNG:**

Herrn Prof. Dr. An-Ping Zeng danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Übernahme des Koreferates. Zudem bedanke ich mich für die sehr gute Betreuung, die vielen hilfreichen Anregungen und die ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang danke ich herzlich für die Übernahme des Hauptreferates.

Herrn Prof. Dr. Christoph Wittmann danke ich herzlich für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission.

Herrn Dr. Hanno Biebl danke ich herzlich für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Anregungen und die Korrektur der Arbeit.

Für die sehr gute Zusammenarbeit am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung danke ich Dr. Enrico Grothe, Dr. Michael Hartlep, Feng He, Dr. Eun-Jin Kim, Dr. Yuanhua Liu, Dr. Nita Prayitno, Dr. Wael Sabra, Dr. Michael Stelzer, Dr. Jibin Sun, Angela Walter, Dr. Wei Wang, Dr. Ping Zheng und allen ehemaligen Mitarbeitern des Bereichs Bioverfahrenstechnik der Gesellschaft für biotechnologische Forschung.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, insbesondere Wiebke Arendt und Gregor Schulz.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Pranee, die mich immer in ganz besonderem Maße unterstützt haben.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN UND LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Eigenschaften von 3-Hydroxypropionaldehyd .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Anwendungsmöglichkeiten von 3-HPA.....</b>	<b>7</b>
<b>2.3</b>	<b>Vom Intermediat zur Plattformchemikalie .....</b>	<b>8</b>
2.3.1	Glycerin als Abfallprodukt der Biodieselherstellung .....	9
2.3.1.1	Rahmenbedingungen .....	10
2.3.1.2	Biodieselproduktionskapazitäten und Auswirkungen auf den Glycerinpreis.....	12
2.3.2	Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd.....	15
2.3.2.1	Chemische Verfahren .....	16
2.3.2.1.1	Der DuPont/Degussa Prozess: Acrolein-Hydratisierung zu 3-HPA .....	16
2.3.2.1.2	Shell Prozess: Hydroformylierung von Ethylenoxid zu 3-HPA .....	17
2.3.2.2	Biotechnologische Verfahren: 3-HPA als Intermediat .....	18
2.3.2.2.1	Mikrobielle 1,3-Propandiolherstellung aus Glycerin.....	18
2.3.2.2.2	Stoffwechselwege der Glycerinvergärung bei <i>K. pneumoniae</i> .....	20
2.3.2.2.3	1,3-Propandiolherstellung aus Glucose.....	23
2.3.2.2.4	Wirtschaftlicher Vergleich der verschiedenen Produktionsverfahren für 1,3-Propandiol .....	24
2.3.2.3	Biotechnologische Verfahren: 3-HPA als Endprodukt.....	25
2.3.2.3.1	Aufarbeitung von 3-HPA .....	27
2.3.3	3-Hydroxypropionsäure .....	28
<b>2.4</b>	<b>Charakterisierung wichtiger Enzyme für die 3-HPA Produktion.....</b>	<b>29</b>
2.4.1	Glycerindehydratase/Dioldehydratase.....	30
2.4.2	1,3-Propandiol-Oxidoreduktase .....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Stamm .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Stammhaltung .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3</b>	<b>Medien.....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Vorkulturmedium .....	35
3.3.2	Fermentationsmedium .....	35
<b>3.4</b>	<b>Kultivierungsbedingungen .....</b>	<b>36</b>
3.4.1	Vorkultur .....	36
3.4.2	Kultivierung im Fermenter.....	37
3.4.2.1	Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration.....	37
3.4.2.2	Messung des pH-Werts und des Redoxpotentials.....	37
3.4.3	Prozessführung und Regelstrecken .....	38
3.4.4	Biotransformation .....	40
<b>3.5</b>	<b>Online-Analytik und Online-Datenaufnahme .....</b>	<b>41</b>
3.5.1	Kohlendioxidbestimmung im Abgas.....	41
3.5.2	Sauerstoffbestimmung im Abgas .....	42
3.5.3	Datenaquisition .....	42

<b>3.6</b>	<b>Offline-Analytik .....</b>	<b>42</b>
3.6.1	Bestimmung der optischen Dichte .....	42
3.6.2	Bestimmung der Biotrockenmasse .....	42
3.6.3	Bestimmung von Cystein .....	43
3.6.4	Gaschromatographische Bestimmung .....	44
3.6.4.1	Gaschromatographische Bestimmung der Fermentationsprodukte.....	44
3.6.4.2	Gaschromatographische Bestimmung von Aceton .....	45
3.6.5	Enzymatische Analysen .....	45
3.6.6	Probenvorbereitung der Biotransformationsproben für die enzymatischen Analysen .....	45
3.6.7	3-Hydroxypropionaldehyd-Messung (3-HPA).....	46
3.6.8	Bestimmung von Semicarbazid durch HPLC.....	47
<b>3.7</b>	<b>Berechnungen:.....</b>	<b>47</b>
3.7.1	Bestimmung der Wachstumsrate.....	47
3.7.2	Berechnung von OTR, CTR, RQ .....	48
3.7.3	Berechnungen der Produktbildungsrate und Ausbeute.....	49
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Produktion aktiver Biomasse in Batch-Kultur.....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Strikt aerobe Biomasseproduktion .....	50
4.1.2	Zellproduktion unter sauerstofflimitierten Bedingungen .....	53
4.1.3	Biomasseproduktion unter anaeroben Bedingungen .....	56
4.1.4	Zusammenfassung .....	59
<b>4.2</b>	<b>Optimierung der Produktion aktiver Biomasse im Fed-Batch-Verfahren .....</b>	<b>61</b>
4.2.1	Produktion aktiver Biomasse mit Glycerin .....	61
4.2.2	Optimierung der Biotransformation .....	68
4.2.3	Produktion aktiver Biomasse mit Glucose .....	72
<b>4.3</b>	<b>Aufarbeitung .....</b>	<b>76</b>
4.3.1	Suche nach einem alternativen Aufarbeitungsweg.....	78
4.3.1.1	Alternative 1: Destillation .....	78
4.3.1.2	Alternative 2: Extraktion .....	78
4.3.1.3	Alternative 3: Verdrängungsreaktion .....	80
4.3.1.3.1	Untersuchungen zur Semicarbazonbildung .....	80
4.3.1.3.2	Untersuchung der Verdrängungsreaktion mit Aceton .....	83
4.3.2	Aufarbeitungswege nach Wahl der Folgeprodukte .....	85
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG: PROBLEMATIK DER SCHEINBAREN ERHÖHUNG DES pO<sub>2</sub>-WERTS.....</b>	<b>104</b>
7.1	Beschreibung des Phänomens .....	104
7.2	Cystein als verstärkende Substanz des scheinbaren pO <sub>2</sub> -Werts .....	107
7.3	Anaerobe Fermentationen zur Bestimmung des scheinbaren pO <sub>2</sub> -Werts .....	111
7.4	Fazit.....	114

# SYMBOL- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
3-HPA	3-Hydroxypropionaldehyd
3-Hp	3-Hydroxypropionsäure
AU	Arbitrary Units: Reuterin-Aktivitäts Einheit, definiert als der Reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die kein Wachstum des Indikatorstammes erlaubt
B100	Biodiesel als Reinkraftstoff nach DIN EN 14214
B5	Blendkomponente 5 %: Beimischung zu Dieselmotortreibstoff nach DIN EN 590
BImSchG	Bundes-Immissionsschutzgesetz
BTM	Biotrockenmasse
BVerfG	Bundesverfassungsgericht
BvR	Bundesverfassungsrichter
CAS	Chemical Abstracts Service
cfu	colony-forming units
CO <sub>2</sub> äq	CO <sub>2</sub> -Äquivalent
DDH	Dioldehydratase
dha	Dihydroxyaceton
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
EC-Number	Enzyme Commission number
EG	Europäische Gemeinschaft
EN	Europäische Normen
EnergieStG	Energiesteuergesetz
EU	Europäische Union
FAME	fatty acid methyl ester / Fettsäuremethylester
FT	Interferometer
GC	Gaschromatograph
GDHt	Glycerindehydratase
glp	Glycerin-3-Phosphat
GMO	genetically modified organism / Gentechnisch veränderter Organismus
HPA	3-Hydroxypropionaldehyd
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
k.A.	keine Angaben
Kat	Katalysator
LD <sub>50</sub>	Die LD50 bezeichnet die Dosis eines Wirkstoffes, die nach einmaliger Verabreichung innerhalb eines gewissen Zeitraumes bei 50 % der behandelten Organismen den Tod verursacht
M	Molarität
MIC	Minimal Inhibitory Concentration

MinöStG	Mineralölsteuergesetz
MO	Mikroorganismus
MTBE	Methyl-tert-butylether
OD	Optische Dichte
PD	1,3-Propandiol
PDOR	1,3-Propandiol-Oxidoreduktase
PTS-System	Phosphotransferase-System
RI	Refraktionsindex
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
Sdp	Siedepunkt
UBICON	Universal-Bioprocess-Control-System
UV	Ultraviolett
VK	Vorkultur (-medium)
vvm	Gasvolumen pro Flüssigkeitsvolumen pro Minute

## Symbole und Formelzeichen

$K_p$	[-]	proportionaler Anteil der Verstärkung K
$n_D$	[-]	Brechungsindex / Brechzahl
$\mu$	[h <sup>-1</sup> ]	Wachstumsrate
c	[mol l <sup>-1</sup> ]; [g l <sup>-1</sup> ]	Stoffmengenkonzentration / Konzentration
CTR	[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Karbondioxidfransferrate
d	[g/l]	Dichte
F	[-]	Faktor
K	[-]	Nernst'sche Verteilungskoeffizient
$K_i$	[-]	integrierender Anteil der Verstärkung K
m	[g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Erhaltungskoeffizient
M	[g mol <sup>-1</sup> ]	molare Masse
$\dot{m}$	[g h <sup>-1</sup> ]	Massenstrom
OTR	[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Sauerstofffransferrate
$\dot{Q}$	[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	volumetrische Verbrauchs- oder Produktionsrate
Q	[g/l]	Rate
RQ	[-]	Respirationskoeffizient
t	[h]	Zeit
V	[l]	Volumen / Fermentationsvolumen



X	[g l <sup>-1</sup> ]	Biomassekonzentration
x	[mol mol <sup>-1</sup> ]	Molanteil
y	[g g <sup>-1</sup> ]	Ausbeutekoeffizient
Y	[%] [mol/mol]	Ausbeute
$\dot{V}$	[l h <sup>-1</sup> ]	Volumenstrom / Begasungsrate

## Indices

F	Feed / Zufütterung
L	Lauge
S	Substrat
set	gewählt / eingestellt
t	Zeit
T	Zeitpunkt
X	Biomasse
ein	Eingang / Zuluft
aus	Ausgang / Abluft
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
R	Reaktions- / Arbeits-
M	Molar
bidest	bidestilliert
PD	1,3-Propandiol
3-HPA	3-Hydroxypropionaldehyd
Gly	Glycerin
P	Produkt

---

## 1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

---

Die Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) aus Glycerin ist von großem industriellen Interesse, sowohl von der Rohstoff- als auch von der Produktseite her. Zum einen fällt Glycerin durch die verstärkte Biodieselproduktion aus Rapsöl in zunehmenden Maße als Abfallprodukt an und wird so zu einem günstigen und leicht zugänglichen Substrat, zum anderen kann 3-HPA als Plattformchemikalie verwendet werden, weil es sich relativ leicht in eine große Zahl von Grundchemikalien wie Acrolein, 3-Hydroxypropionsäure, Acrylsäure, Malonsäure und Acrylamid oder auch in andere industriell interessante Chemikalien wie 1,3-Propandiol überführt werden kann. 3-HPA besitzt außerdem ein großes Potential als Antibiotikum. Es hat bakterizide, fungizide und protozoide Wirkung gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen und kann daher als ein Konservierungsstoff in der lebensmittelverarbeitenden und pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden.

3-HPA ist ein Metabolit im reduktiven Glycerinstoffwechsel von vielen Mikroorganismen, dazu gehören die Gattungen *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium* und *Lactobacillus*. Eine Akkumulation von 3-HPA ist für den wachsenden Organismus eigentlich toxisch (Sobolov und Smiley, 1960; Talarico *et al.*, 1988; Barbirato *et al.*, 1996). Zwei verschiedene Verfahren wurden bisher untersucht, um 3-HPA in signifikanter Menge zu produzieren und diese Toxizität zu vermeiden. Beide Verfahren benutzen eine zweistufige Prozessstrategie: In der ersten Stufe wird aktive Biomasse produziert, die in der zweiten Stufe den Umsatz von Glycerin in 3-HPA katalysiert.

Im ersten Verfahren wird *Lactobacillus reuteri* als Produktionsstamm verwendet. 3-HPA kann in Gegenwart von Glucose und Glycerin heterofermentativ produziert werden (Talarico *et al.*, 1988). Allerdings lassen sich höhere Produktkonzentrationen nur mit einer zweistufigen Prozessstrategie erreichen (Vollenweider *et al.*, 2003). Hierbei muss zuerst Biomasse in einer Fermentation gewonnen werden, die dann zur Produktion von 3-HPA in wässrige Glycerinlösung verbracht wird. Der Stamm wie auch das Produkt Reuterin (zyklisches, dimeres 3-HPA) wurden 1988 patentiert (Lindgren und Dobrogosz, 1988).

Im zweiten Verfahren kommt *Klebsiella pneumoniae* als Produktionsstamm zur Anwendung. Zuerst wird aktive Biomasse durch eine Glycerinfermentation gewonnen, die dann zur Produktion von 3-HPA in einer gepufferten Semicarbazidlösung verwendet wird. Normalerweise wird Glycerin von *K. pneumoniae* unter anaeroben Bedingungen zu 1,3-Propandiol verstoffwechselt, wobei 3-HPA das Zwischenprodukt darstellt. Die maximale Ausbeute an 1,3-Propandiol ist dabei auf einen Wert von 72 % (mol/mol) beschränkt, da ein Teil des Substrates für die Herstellung von Reduktionsäquivalenten benötigt wird, um 3-HPA in 1,3-Propandiol zu reduzieren. Durch die Verwendung von Semicarbazid kann 3-HPA abgefangen werden. Die weitere Umwandlung zu 1,3-Propandiol wird dann blockiert und die theoretische Ausbeute beträgt dann 100 % (mol/mol). Diese Methode beruht auf den Kenntnissen von Abeles *et al.* (1960) und wurde von Slininger und Bothast (1982; 1983) weiterentwickelt und patentiert (Slininger und Bothast, 1990).

In dieser Arbeit wurde *K. pneumoniae* als Modellorganismus verwendet, um die Produktion von 3-HPA mit Hilfe von Semicarbazid zu steigern.

Folgende Zielsetzung war gegeben:

- Evaluierung optimaler Bedingungen für die Produktion aktiver Biomasse.
- Steigerung der Ausbeute in der 3-HPA produzierenden Stufe.
- Steigerung der Endkonzentration in der 3-HPA produzierenden Stufe.
- Evaluierung von Aufarbeitungsmöglichkeiten für das gewählte 3-HPA produzierende Verfahren.

---

## 2 GRUNDLAGEN UND LITERATURÜBERSICHT

---

Das folgende Kapitel gibt einen Überblick über die Grundlagen und Herstellungsmethoden von 3-Hydroxypropionaldehyd. Es werden die chemischen Eigenschaften von 3-HPA beschrieben, wie auch das bisherige Vorkommen als Intermediat in der chemischen Industrie zur Produktion von 1,3-Propandiol. Die gesetzlichen Rahmenbedingungen werden beschrieben, die dazu geführt haben, dass Glycerin als günstiges und leicht zugängliches Substrat vorliegt. Es wird ein Überblick über die biotechnologischen Verfahren gegeben, die dann miteinander verglichen werden. Als weiterer wichtiger Punkt werden die Aufarbeitungsmöglichkeiten von 3-HPA benannt und verglichen.

### 2.1 EIGENSCHAFTEN VON 3-HYDROXYPROPIONALDEHYD

3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA), in rationaler Nomenklatur 3-Hydroxypropanal, ist ein Aldehyd mit der Summenformel  $C_3H_6O_2$  mit einem Siedepunkt von  $38,1^\circ\text{C}$  bei 0,3 mbar (Weast, 1990). Die CAS-Nummer lautet 2134-29-4.

3-HPA ist schwer chemisch rein herzustellen. Bei der Destillation bildet es schnell ein sehr viskoses Öl, das sich als eine bi- oder polymolekulare Verbindung darstellt, außerdem tritt im Vorlagekolben ein Harz auf (Nef, 1904; Hall und Stern, 1950), siehe auch Kapitel 2.3.2.3.1.

In wässriger Lösung bildet 3-HPA ein kompliziertes chemisches Gleichgewichtsgemisch. Dabei stehen nach Vollenweider *et al.* (2003) bei neutralem pH-Wert und  $20^\circ\text{C}$  3-HPA, hydratisierter 3-HPA (1,1,3-Trihydroxypropan) und cyclischer 3-HPA (2-(2-Hydroxyethyl)-4-hydroxy-1,3-dioxan) im Gleichgewicht (Abbildung 2.1):

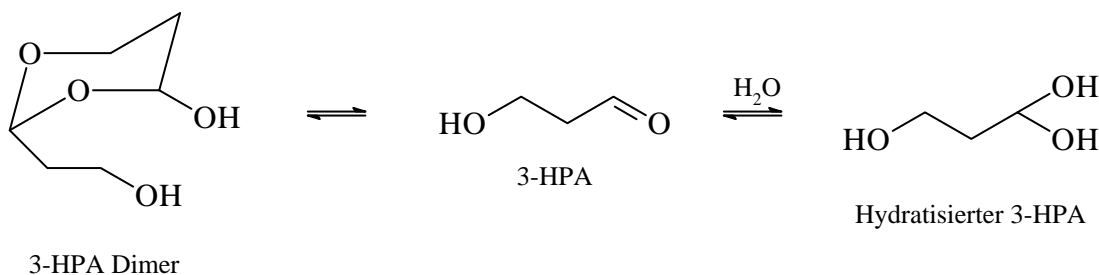


Abbildung 2.1: Gleichgewichtsreaktionen von 3-HPA in wässriger Lösung  
(Vollenweider *et al.*, 2003).

Je nach Konzentration des 3-HPA in Wasser können auch Tri- und Tetramere des 3-HPA nachgewiesen werden (Vollenweider *et al.*, 2003).

Dieses Gleichgewicht kann im Bereich von pH 4,1-7,0 als eine Funktion der Molfraktionen über der Konzentration des 3-HPA in Wasser dargestellt werden (Abbildung 2.2).

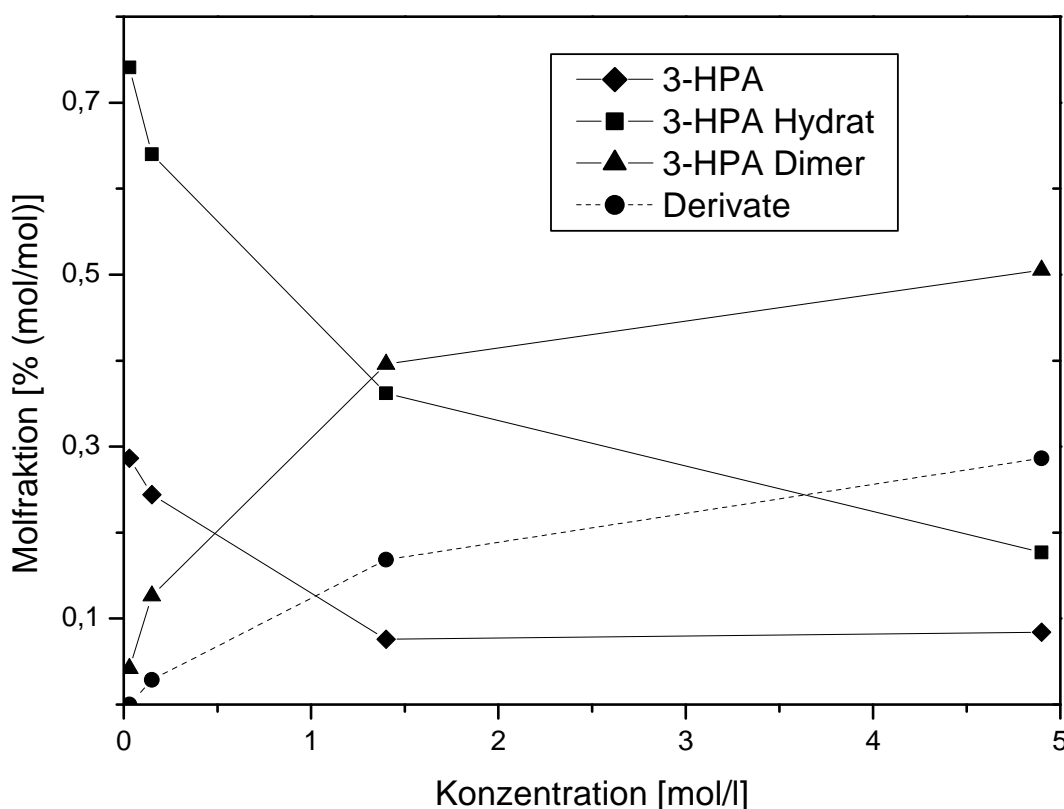


Abbildung 2.2: Abhängigkeit der Gleichgewichtsverteilung des 3-HPA-Systems von der Konzentration in wässriger Lösung bei 20°C, gemessen mit quantitativer  $^{13}\text{C}$  NMR (Vollenweider *et al.* 2003).

Verlässt man diesen pH-Bereich treten Aldolprodukte und verschiedene weitere Polymerisationsprodukte auf (Abbildung 2.3).

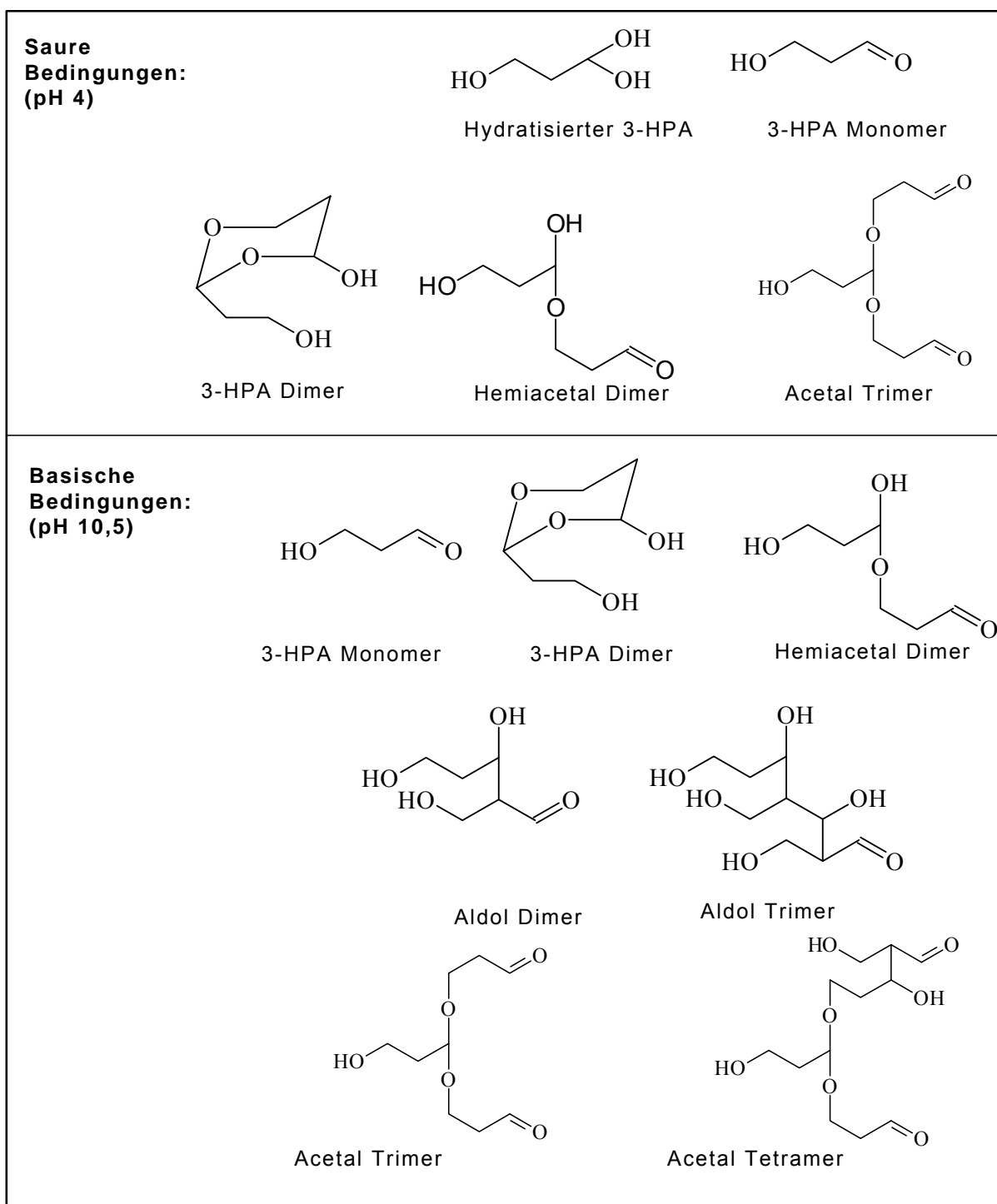


Abbildung 2.3: Verschiedene Formen von 3-HPA in sauren oder basischen wässrigen Lösungen, gemessen mit  $^{13}\text{C}$  NMR und FT-IR Spektroskopie (Sung et al., 2003).

Unter stark sauren Bedingungen und unter Erwärmung steht 3-HPA im Gleichgewicht mit Acrolein (Hall und Stern, 1950; Arntz *et al.*, 1991; Vollenweider und Lacroix, 2004), bzw. das Gleichgewicht verschiebt sich zum Acrolein. Die Gleichgewichtskonstante für die Dimerisierung ist stark temperaturabhängig und somit ist auch eine Temperaturabhängigkeit der

Nebenreaktion gegeben (Abbildung 2.4), da auf Grund der Dimerbildung jede zweite freie OH-Gruppe des 3-HPA maskiert ist und nicht mehr mit dem Acrolein addiert werden kann (Arntz *et al.*, 1991).

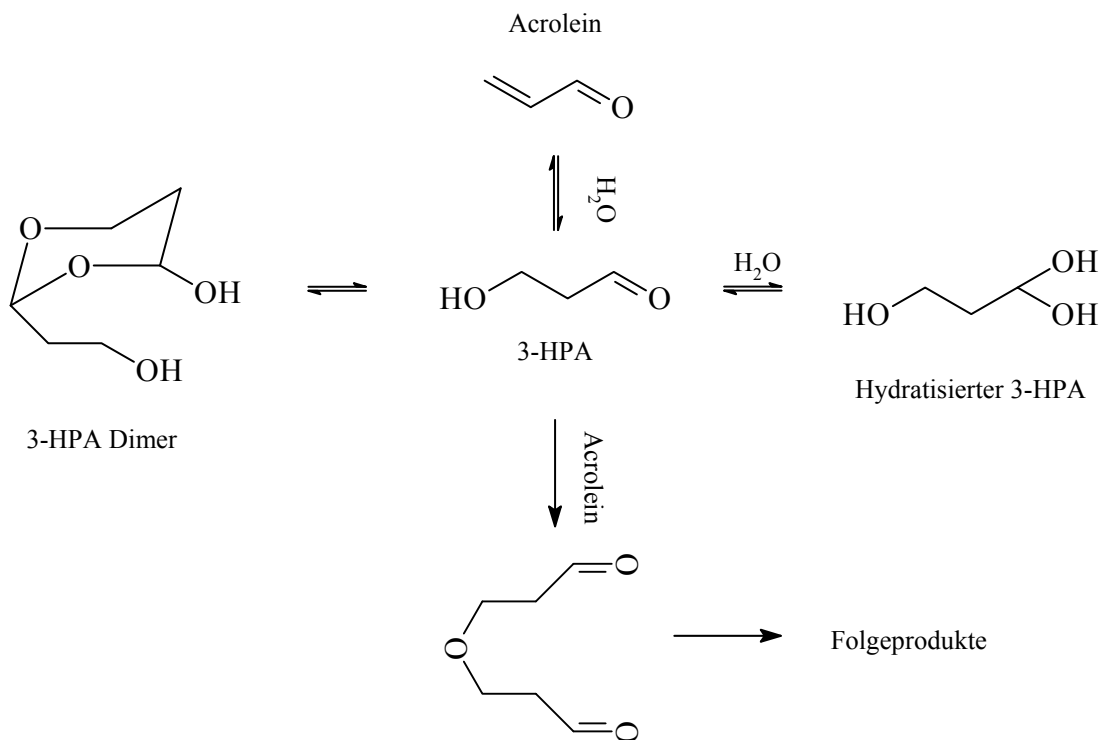


Abbildung 2.4: Reaktionsschema der Acrolein-Hydratisierung (Arntz *et al.*, 1991).

## 2.2 ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN VON 3-HPA

3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) ist zusammen mit 3-Hydroxypropionsäure (Kapitel 2.3.3) vielseitig verwendbar. Die beiden Verbindungen können als Grundlage zur Herstellung vieler moderner Chemikalien wie Acrylsäure, Malonsäure und 1,3-Propandiol verwendet werden (Abbildung 2.5).

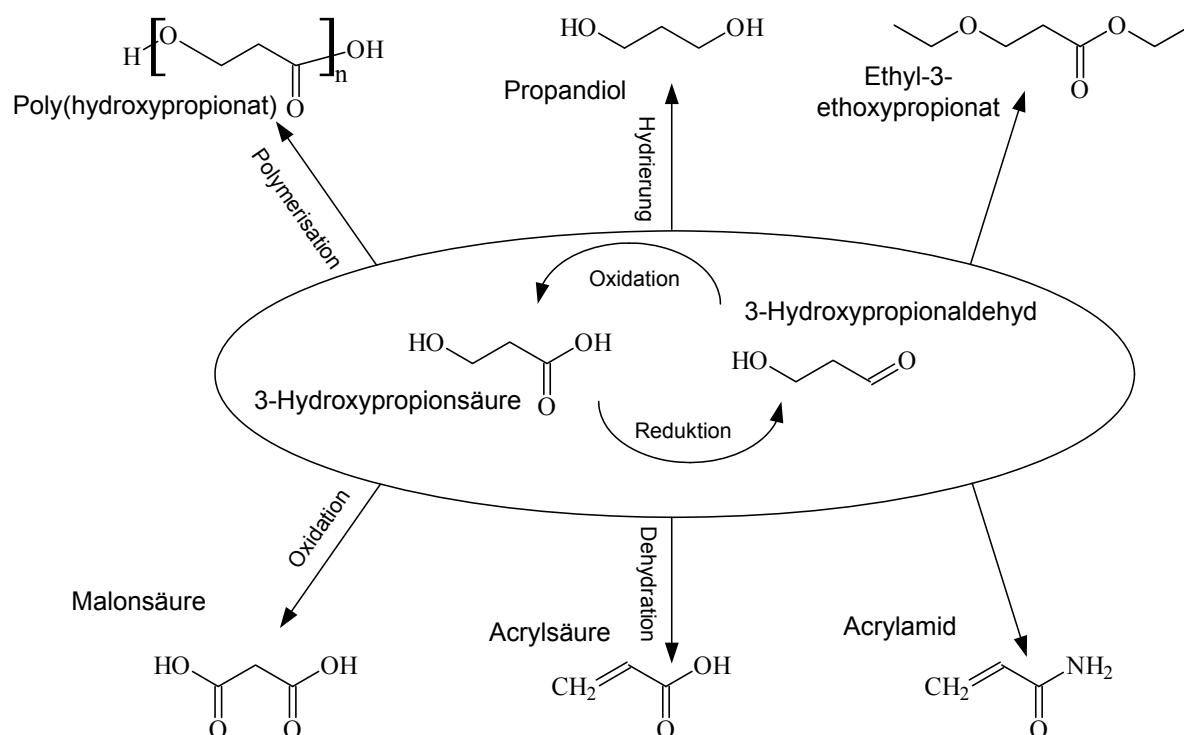


Abbildung 2.5: 3-Hydroxypropionaldehyd und 3-Hydroxypropionsäure als neue Basischemikalie modifiziert nach Gokarn et al. (2002).

Poly(hydroxypropionat) hat ähnliche chemische Eigenschaften wie die bekannte Polyhydroxybuttersäure (Craciun *et al.*, 2005). Ethyl-3-ethoxypropionat (EEP) wird als Lösungsmittel oder Lösungsvermittler vor allem in der Farbenindustrie eingesetzt (Heckmann *et al.*, 2005). Wie erwähnt hat 3-HPA auch ein großes Potential als Antibiotikum: Es hat bakterizide, fungizide und protozoide Wirkung gegenüber einer Vielzahl von Mikroorganismen und kann daher als Konservierungsstoff in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie eingesetzt werden (Tabelle 2.1).



Tabelle 2.1: Anwendungsmöglichkeiten von 3-HPA als Antibiotikum (El-Ziney *et al.*, 2000; Vollenweider und Lacroix, 2004).

Anwendung	Konzentration	Quelle
<b>Gram-positive Bakterien:</b> <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i>	2-40 MIC (AU/ml)	Chung <i>et al.</i> (1989); El-Ziney (1997); El-Ziney <i>et al.</i> (2000)
<b>Gram-negative Bakterien:</b> <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Salmonella</i>	2-4 MIC (AU/ml)	
<b>Hefen:</b> <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Torulopsis</i>	2-16 MIC (AU/ml)	
<b>Pilze:</b> <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i>	8 MIC (AU/ml)	
<b>Protozoen</b> <i>Trypanosoma</i>	1 MIC (AU/ml)	
<b><i>Listeria nonocytogenes</i></b> (H-Milch)	150 AU/ml	El-Ziney <i>et al.</i> (1999)
<b><i>Escherichia coli</i> O157:H7</b> (Fleischoberfläche)	100-500 AU/g	
<b>Maus</b> <i>Mus musculus</i>	LD <sub>50</sub> 1500 U (7,5 mg)	Yunmbam und Roberts (1993)
<b>Biologische Tissue-Fixation</b>	0,068 M	Sung <i>et al.</i> (2002; 2003)

#### Legende:

MIC = Minimal Inhibitory Concentration

AU = Arbitrary Units: Reuterin-Aktivitäts-Einheit, definiert als der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die kein Wachstum des Indikatorstammes erlaubt (Mayr-Harting *et al.*, 1972)

U = Unit = 1 U = 5 µg Reuterin/ml

### **2.3 VOM INTERMEDIAT ZUR PLATTFORMCHEMIKALIE**

Bisher wurde 3-HPA vor allem als Intermediat auf Basis fossiler Rohstoffe in der chemischen Industrie verwendet (Kapitel 2.3.2.1). Heutzutage ist es jedoch wirtschaftlich sinnvoll, 3-HPA oder Folgeprodukte wie 1,3-Propandiol auf Basis nachwachsender Rohstoffe mit Glycerin als Substrat zu produzieren (Abbildung 2.6) und daher fokussiert sich die Forschung zunehmend darauf. Dieser Trend wurde durch eine geänderte Gesetzeslage initiiert (Kapitel 2.3.1). Durch den darauf folgenden „Boom“ der Biodieselproduktion weltweit ist Glycerin ein kostengüns-

tiges und leicht zugängliches Substrat geworden. Daher kann 3-HPA mit Glycerin als Substrat noch kostengünstiger produziert werden und somit als Basis- bzw. Plattformchemikalie dienen und in die verschiedenen Folgeprodukte umgesetzt werden (Abbildung 2.5). Plattformchemikalien werden als die Chemikalien definiert, die als Plattform bzw. Grundchemikalie für die Synthese mehrerer Bulk-Chemikalien dienen. Bulk-Chemikalien werden als die Chemikalien definiert, die in einer Quantität größer als 50000 t/a produziert werden (van Haveren und Elinor, 2008).

## Fossile Rohstoffe

## Nachwachsende Rohstoffe

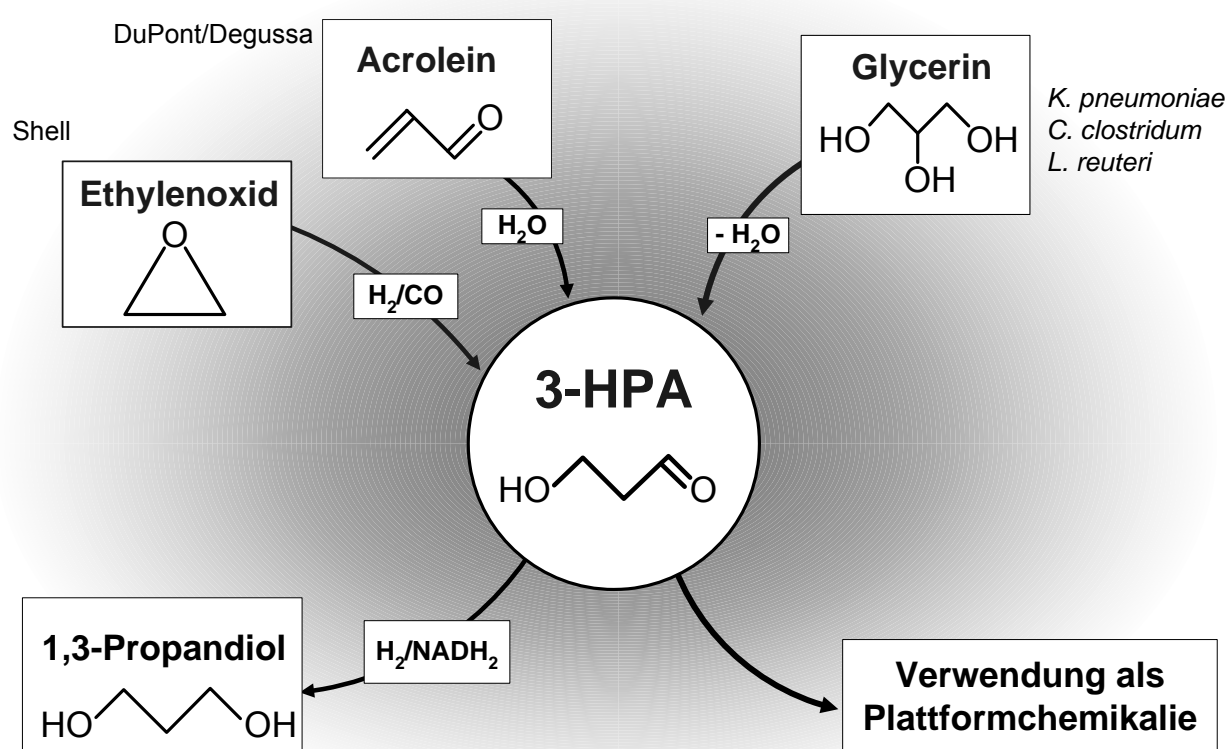


Abbildung 2.6: 3-HPA: Vom Intermediat zur Plattformchemikalie. 3-HPA als Intermediat in der chemischen Industrie und zur Anwendung als Grundchemikalie durch die biotechnologische Produktion.

### 2.3.1 Glycerin als Abfallprodukt der Biodieselherstellung

Glycerin fällt bei der Produktion von Biodiesel, Seifen und Fettsäuren als Nebenprodukt an. Bei der Produktion von Biodiesel, der Umesterung von Fettsäuren aus Rapsöl zu Rapsölmethylester, fallen ca. 10 % Glycerin an (CD Römpf, 1995). Durch die gegebenen gesetzlichen Rahmenbedingungen ist die Produktionskapazität in den letzten Jahren drastisch gestiegen und somit auch der Glycerinpreis erheblich gesunken.

### 2.3.1.1 Rahmenbedingungen

Die Erhaltung und Bewirtschaftung der Ressourcen ist ein wesentlicher Politikbereich einer umweltverträglichen nachhaltigen Entwicklung, der 1992 mit der Agenda 21 als Aktionsprogramm für das 21. Jahrhundert von mehr als 170 Staaten in Rio de Janeiro verabschiedet und auf dem Weltgipfel für nachhaltige Entwicklung in Johannesburg im September 2002 fortgeschrieben wurde. Die Agenda 21 hat die Zielsetzung, neue Lösungen zu suchen, um den derzeitigen Prozess des rasanten Verbrauchs von fossilen, nicht erneuerbaren Ressourcen (Erdöl, Erdgas, Kohle, Mineralien) zu verringern. Zur Zeit wird die statistische Reichweite der Erdölvorräte weltweit bei gegenwärtiger Förderung auf ca. 40 Jahre geschätzt (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, 2007).

In den Vereinigten Staaten von Amerika wird erwartet, dass bis zum Jahre 2020 25 % der derzeitig fossil-basierten organischen Grundstoffe (Basis-Wert 1994) und 10 % der Öle und Kraftstoffe auf eine biologische Rohstoffbasis umgestellt und vorrangig mittels Bioraffinerietechnologien produziert werden. Das industriegeführte „Biomass Technical Advisory Committee“ (BTAC) der USA hat solche Ziele in einem Stufenplan bis zum Jahre 2030 für die Bereiche Bioenergie, Biokraftstoffe und Bioprodukte konkretisiert (Tabelle 2.2, Technical Advisory Committee Biomass R&D, 2002; Kamm und Kamm, 2004).

*Tabelle 2.2: Nationale Ziele der USA bei Biomasse-Technologien.*

<b>Jahr</b>	<b>2002</b>	<b>2010</b>	<b>2020</b>	<b>2030</b>
<b>BioFuels / Biokraftstoffe</b>	0,5 %	4 %	10 %	20 %

In Europa gibt es neben dem Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien vom 21. Juli 2004 (Erneuerbaren-Energien-Gesetz, EEG) nun auch aktuell erste Festlegungen zur Substitution von nicht erneuerbaren Ressourcen im Bereich der Kraftstoffe durch Kraftstoffe auf Basis von Biomasse. In der EU-Richtlinie 2003/30/EG zur Förderung der Verwendung von Biokraftstoffen oder anderen erneuerbaren Kraftstoffen im Verkehrssektor vom 8. Mai 2003 gelten als Biokraftstoffe: Bioethanol, Biodiesel, Biogas, Biomethanol, Biodimethylether, Bio-ETBE (Ethyl-Tertiär-Butylether auf Basis von Bioethanol), Bio-MTBE (Methyl-Tertiär-Butylether auf Basis von Biomethanol), synthetische Biokraftstoffe, Biowasserstoff und reines Pflanzenöl. Die Mitgliedsstaaten der EU sind aufgefordert, nationale Richtwerte für einen Mindestanteil an Biokraftstoffen und anderen erneuerbaren Kraftstoffen festzulegen, wobei als Bezugswert bis zum Jahre 2005 ein Anteil von 2 % und bis zum Jahr 2010 ein Anteil von 5,75 % gemessen am Energieinhalt aller Otto- und Dieselmkraftstoffe gilt.

Tabelle 2.3 fasst die EU-Ziele unter Einbeziehung der Ziele von Deutschland zusammen (Richtlinie 2003/30/EG; Kamm und Kamm, 2004).

*Tabelle 2.3: Ziele der EU und Deutschlands beim Einsatz erneuerbarer Rohstoffe und Energien.*

<b>Jahr</b>	<b>2001</b>	<b>2005</b>	<b>2010</b>	<b>2020</b>
<b>Biokraftstoffe/Biomasseanteil bei Kraftstoffen</b>	0,5 %	4 %	10 %	20 %

War die EU bisher sowohl in der Anbaufläche als auch in der Anbaumenge von Ölsaaten durch das Blair-House Abkommen (1992) stark restriktiert, wurde durch die Agenda 2000 (1999) die kulturspezifische Förderung in eine Flächenbeihilfe umgewandelt und somit die Begrenzung aufgehoben. Durch die Richtlinie 2003/30/EG wurden die Ziele der europäischen Union definiert, die in nationale Gesetze durch die jeweiligen Regierungen umzusetzen sind. Die Richtlinie wurde u.a. in Deutschland durch Mineralölsteuerbegünstigungen für Biokraftstoffe und durch die Änderung des Mineralölsteuergesetzes (MinöStG) bzw. der entsprechenden Normen DIN EN 590 (Biodiesel, B5) und DIN EN 228 (Bioethanol, E5) umgesetzt, die eine Beimischung bis zu 5 % des alternativen zum herkömmlichen Kraftstoff erlauben. Reiner Biodiesel wird nach DIN EN 14214 als B100 gehandelt. Mineralöle waren in dem Umfang steuerbegünstigt, in dem sie Biokraftstoffe enthielten. Diese Steuerbegünstigungen wurden durch den Gesetzgeber bis zum 31. Dezember 2008 befristet und durch das Steueränderungsgesetz vom 15. Dezember 2003 bis zum 31. Dezember 2009 verlängert. Das Mineralölsteuergesetz wurde dahingehend geändert, dass die Steuerbegünstigung für Biokraftstoffe nicht zu einer Überkompensation der Mehrkosten in Zusammenhang mit deren Erzeugung führen dürfe. Zur Überprüfung, ob eine Überkompensation vorliegt, wurde die Erstellung eines jährlichen Biokraftstoffberichts veranlasst.

In dem für das Jahr 2004 erstatteten Biokraftstoffbericht vom Juni 2005 wurde eine Überkompensation der herstellungsbedingten Mehrkosten von Biodiesel durch die Steuervergünstigung festgestellt. Es wurde eine Rückführung der Überkompensation veranlasst. Darüber hinaus wurde im Koalitionsvertrag der Regierungskoalition vom 1. November 2005 festgeschrieben, die Mineralölsteuerbefreiung für Biokraftstoffe durch die Einführung einer Beimischungspflicht zu ersetzen.

Am 1. Januar 2007 trat das angekündigte Gesetz zur Einführung einer Biokraftstoffquote durch Änderung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (BImSchG) und zur Änderung energie- und stromsteuerrechtlicher Vorschriften (Biokraftstoffquotengesetz) vom 18. Dezember 2006 in Kraft. Damit wurde für Otto- und Dieselkraftstoffe die Pflicht zur Beimischung eines

Mindestanteils an Biokraftstoff eingeführt (§ 37a BImSchG), für den keine Steuerentlastung gewährt wird (§ 50 Abs. 1 Satz 4 EnergieStG). Biokraftstoff wird zudem nach § 50 Abs. 1 Satz 5 EnergieStG in Höhe der Beimischungsquote (so genannte „fiktive Quote“) auch dann besteuert, wenn er als reiner Biokraftstoff abgegeben wird. Im Übrigen blieb es bei der bereits zum August 2006 eingeführten teilweisen Steuerbefreiung für Biodiesel und Pflanzenöl. §50 Abs. 3 Satz 3 Nr. 1 und 2 EnergieStG sehen für diese Biokraftstoffe weiterhin ein kontinuierliches Abschmelzen der Steuerentlastung in Jahresschritten vor, das bei Biodiesel zum 1. Januar 2007 und für Pflanzenöl zum 1. Januar 2008 beginnt und für beide Kraftstoffe zum 31. Dezember 2012 einen Sockelentlastungsbetrag von 2,14 Cent je Liter erreicht (BVerfG, 1 BvR 1031/07). Nach §50 Absatz 3 Satz 3 Nr. 1 in Verbindung mit § 2 Absatz 1 Nr. 4 Energiesteuergesetz (EnergieStG) ergeben sich die in Tabelle 2.4 gelisteten Steuerbeträge für Biodiesel. Diese gelten allerdings nach dem Biokraftstoffquotengesetz nur für Biodiesel/Biokraftstoffe über die Erfüllung der Bemischungsquote hinaus. Die Quote setzt sich aus einer Beimischungspflichtquote für Biokraftstoffe in Diesel- bzw. Ottokraftstoffen und einer insgesamten Beimischungsquote für Biokraftstoffe zusammen (Tabelle 2.4).

*Tabelle 2.4: Beimischungsquoten und Steuerentlastung für Fettsäuremethylester (FAME).*

<b>Jahr</b>	<b>Beimischungsquote für Biodiesel [Energiegehalt %]</b>	<b>Beimischungsquote für Ottokraftstoffe [Energiegehalt %]</b>	<b>Gesamte Beimischungsquote [Energiegehalt %]</b>	<b>Mineralölsteuer für FAME [ct/l]</b>
<b>2007</b>	4,4	1,2		49 - 39,9 = 7,1
<b>2008</b>	4,4	2		49 - 33,6 = 13,4
<b>2009</b>	6,25	2,8	6,25	49 - 27,3 = 19,7
<b>2010</b>	6,75	3,6	6,75	49 - 21 = 26
<b>2011</b>	6,75	3,6	7,0	49 - 14,7 = 32,3
<b>2012</b>	6,75	3,6	7,0	49 - 2,1 = 44,9

### 2.3.1.2 Biodieselproduktionskapazitäten und Auswirkungen auf den Glycerinpreis

Durch die im vorhergehenden Kapitel beschriebenen gesetzlich vorgegebenen Ziele sowohl in den USA als auch in Europa wurden die Biodieselproduktionskapazitäten stark ausgebaut. Die europäischen Produktionskapazitäten an Biodiesel stiegen von 2003 von ca. 2,05 Mio. t/a (His, 2005) auf 10,3 Mio. t/a in der Mitte des Jahres 2007 (UFOP, 2007). Deutschland ist mit einer prognostizierten Produktionskapazität 2007 von ca. 5 Mio. t/a sowohl europaweit (Abbildung 2.7) als auch weltweit mit führend – zum Vergleich – die Gesamtproduktionskapazität in den USA betrug 2007 ca. 6,3 Mio. t/a (Sims, 2007). Allerdings sind in Deutsch-

land durch die - mit dem Energiesteuergesetz 2003 eingeführten – Steuervergünstigungen für Biodiesel große Überkapazitäten geschaffen worden (Abbildung 2.8). Aus Fruchtfolge- und Flächennutzungsgründen ist das Flächenanbaupotential der Ölsaaten in Deutschland für die Produktion von Biodiesel auf ca. 2 Mio. t/a begrenzt, so dass diese heutzutage schon importiert werden müssen (BMF, 2007). Die Umstellung der Steuerentlastung zugunsten einer Quotenregelung begrenzt innerhalb Deutschlands rein wirtschaftlich den Biodieselabsatz auf die in Tabelle 2.5 aufgeführten Quotenwerte.

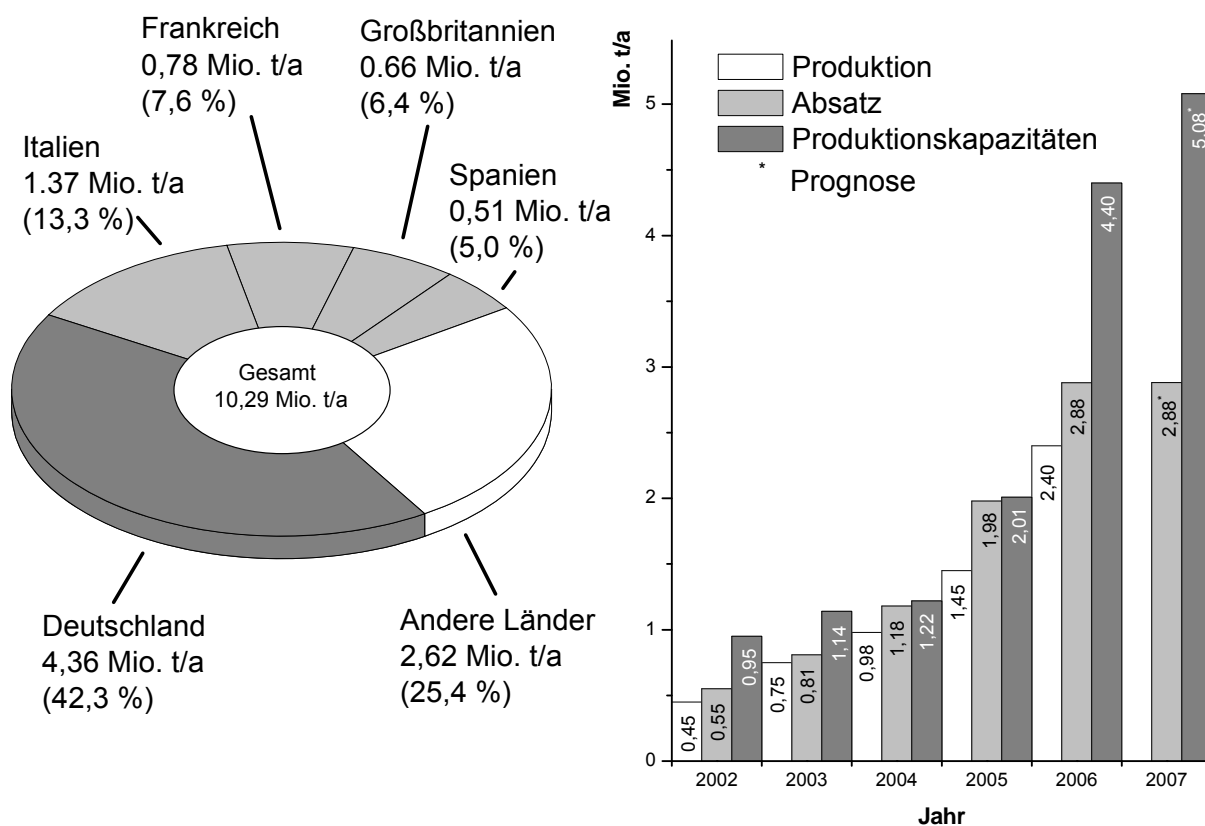


Abbildung 2.7: Produktionskapazitäten EU-27  
Stand 01.07.2007 (EBB, 2008).

Abbildung 2.8: Biodieselproduktion, Absatz und  
Produktionskapazitäten in  
Deutschland 2002-2007  
(VDB, 2007; UFOP, 2007).

Die stark wachsende Biodieselproduktion führte bereits ab 2002 zu einem Verfall der Preise für raffiniertes Glycerin (97 %) auf einen Wert von ca. 400 €/t (Abbildung 2.9) und lag 2006 bei ca. 420 €/t (Cooper, 2006). Der Ausbau der Produktion bzw. der Produktionskapazitäten wird sich sicherlich nicht in diesem Maße fortsetzen lassen. Die erhöhte Nachfrage an Roh-

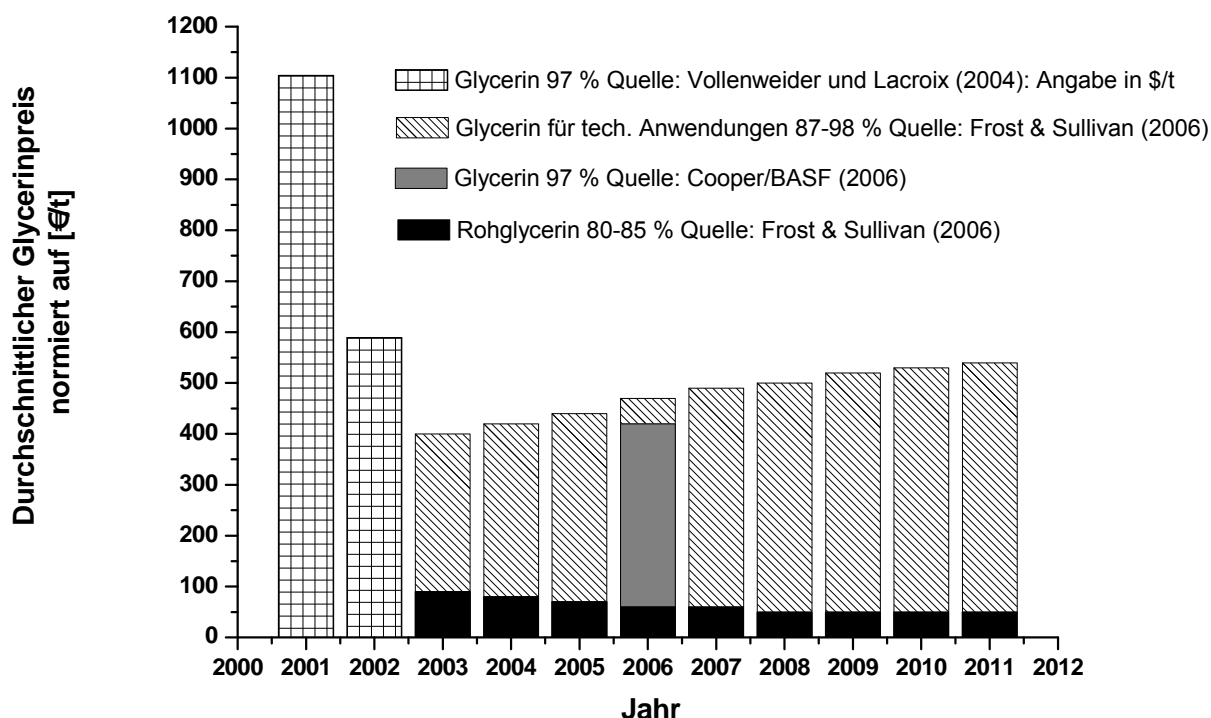


Abbildung 2.9: Übersicht der Preisentwicklung für raffiniertes und Roh-Glycerin.

stoffen der Biokraftstofferzeuger übt bereits einen starken Preisdruck auf die landwirtschaftlichen Rohstoffe aus. Somit stehen die Biokraftstofferzeuger in direkter Konkurrenz mit der Lebensmittelindustrie und Futtermittelherstellern. In Deutschland stieg der Preis von Rapsöl, als einer der Hauptaustausgstoffe der Biodieselherstellung, im Zeitraum von Oktober 2005 bis September 2006 um 20 % gegenüber der Vorjahresperiode (BMF, 2007).

Durch die erhöhten Rohstoffpreise, vor allem aber durch Erschließung neuer Nutzungsmöglichkeiten von raffiniertem Glycerin, wird eine weitere Steigung des Preises für raffiniertes Glycerin vorhergesagt (Frost & Sullivan, 2006).

Bemerkenswert ist die Preisentwicklung für Rohglycerin mit einem Preis von ca. 50 €/t. Dieser geringe Preis wird durch eine geringe Raffineriekapazität für Rohglycerin verursacht. Es wird nicht damit gerechnet, dass die Raffineriekapazität für Rohglycerin in den nächsten Jahren stark anwachsen wird, so dass der Preis von Rohglycerin gleich bleibend bei diesem Niveau prognostiziert wird (Frost & Sullivan, 2006). Auf Grund dieser Ausgangslage wird Rohglycerin deshalb verstärkt in der Futtermittelindustrie bzw. zur Energiegewinnung eingesetzt. Dabei können die Preise durchaus regional variieren, in den USA wird ein Preis von 49-63 €/t

angegeben (Duane, 2007) während für Deutschland ein Preis bis zu 150 €/t angegeben wird (Pollert, 2007).

Eine weitere Steigerung des Absatzes von Biokraftstoffen der „ersten Generation“ ist durchaus gesellschaftspolitisch umstritten. Kritikpunkte sind vor allem relativ hohe CO<sub>2</sub>-äq-Vermeidungskosten, Nachhaltigkeit, Effektivität, Umweltprobleme und Kompatibilität der Fahrzeuge älterer Bauart (Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik, 2007; Sachverständigenrat für Umweltfragen, 2007; Rat für Nachhaltige Entwicklung, 2008; Rettet den Regenwald e.V., 2008; ADAC, 2008)

### **2.3.2 Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxypropionaldehyd**

Wie zu Anfang des Kapitels erwähnt, wurde 3-HPA bisher vor allem in der chemischen Industrie als Intermediat eingesetzt (Kapitel 2.3.2.1). Weiterhin tritt es als Stoffwechselintermediat in natürlich vorkommenden 1,3-Propandiol produzierenden Mikroorganismen mit Glycerin als Substrat auf (Kapitel 2.3.2.2.1). Ein weiteres wichtiges Verfahren ist die 1,3-Propandiolproduktion aus Glucose (Kapitel 2.3.2.2.3), auch hier tritt 3-HPA als Stoffwechselintermediat auf. 1,3-Propandiol (PD), das bedeutendste Folgeprodukt von 3-HPA, ist eine wertschöpfende Chemikalie, vor allem für die Synthese von Polyethylenterephthalaten und der Herstellung von Polyurethanen und cyclischen Komponenten (Zhu *et al.*, 2002). Auf 1,3-Propandiol basierende Polymere zeigen viele besondere Eigenschaften auf, wie z.B. gute Lichtstabilität und verbesserte Elastizität. Sie werden vor allem in der Produktion von Teppichen und Textilfasern eingesetzt (Rada *et al.*, 1986; Witt *et al.*, 1994; Grothe, 2000).

Verfahren für die alleinige Produktion von 3-HPA werden anschließend beschrieben (Kapitel 2.3.2.3), gefolgt von einem Verfahren zur Herstellung von 3-Hydroxypropionsäure (Kapitel 2.3.3), die ähnliche Eigenschaften wie 3-HPA aufweist. Abbildung 2.10 gibt einen Überblick über die verschiedenen Verfahren.



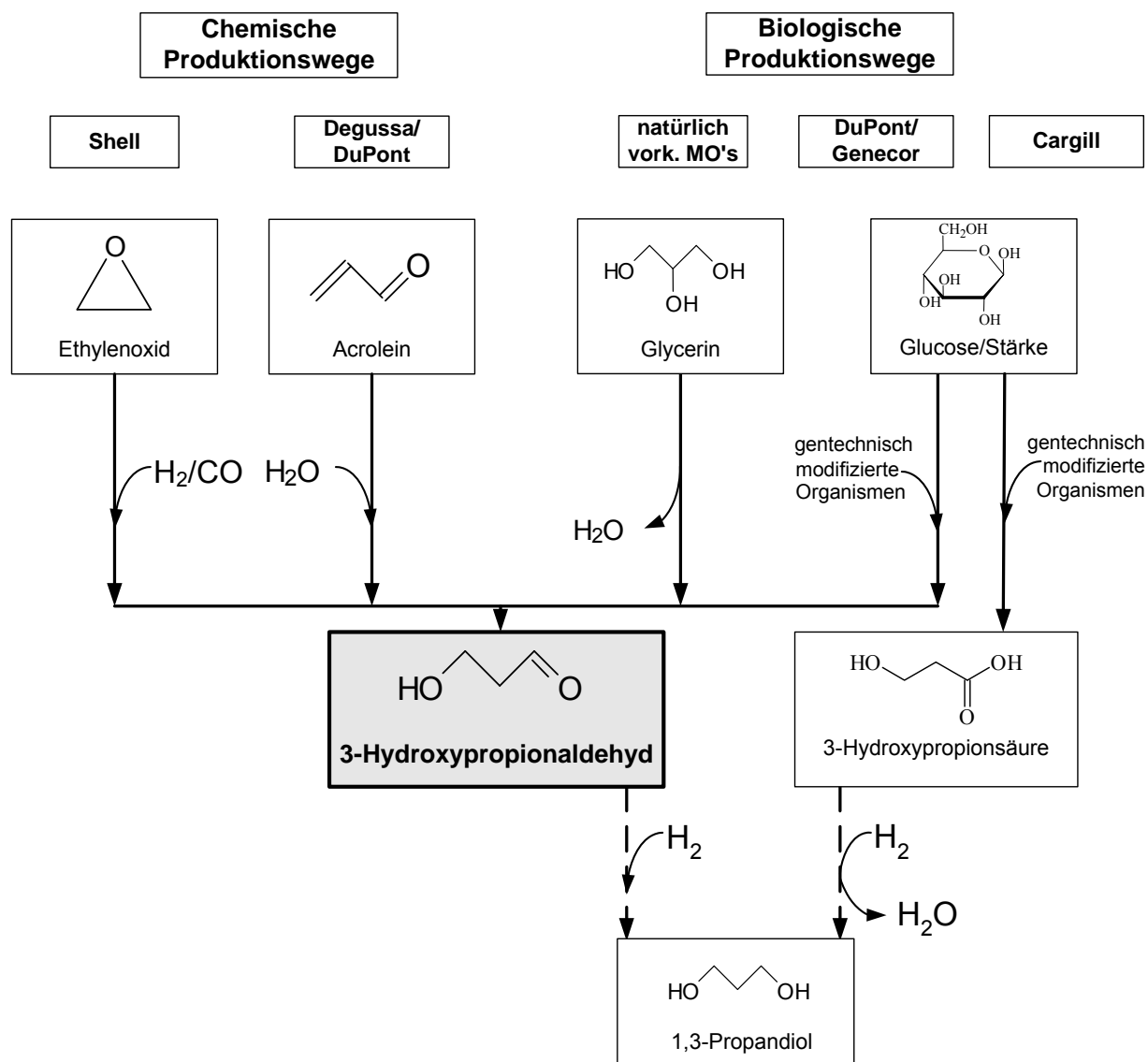


Abbildung 2.10: Übersicht der Produktionsverfahren für 3-HPA.

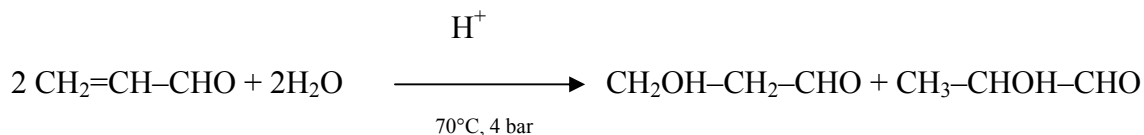
### 2.3.2.1 Chemische Verfahren

#### 2.3.2.1.1 Der DuPont/Degussa Prozess: Acrolein-Hydratisierung zu 3-HPA

Dieser Prozess zur Synthese von 1,3-Propanediol (PD) beruht auf dem herkömmlichen Verfahren von Hall und Stern (1950) zur Herstellung von Acrolein mittels Propylenoxidation und der anschließenden Hydratisierung des Acroleins in Gegenwart eines Kationentauschers. Das entstehende 3-HPA wird über Ruthenium-Katalysatoren zu PD hydriert (Arntz, 1991). Der Prozess gliedert sich nach Grothe (2000) in 5 Prozessstufen:

**Vorbereitung des Ionenaustauschers:**

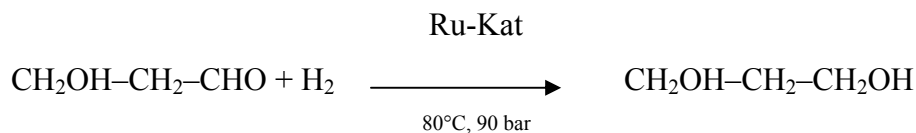
Eine Polyacrylamidmatrix wird mit Acrylsäure bei 80-100°C zu einem Polyamin-poly-carbonsäureharz umgesetzt.

**Hydratisierung von Acrolein:**

Acrolein wird zu 65 % in 3-HPA umgewandelt. Die Reaktion erfolgt in Polyaminharz-Festbettreaktoren mit einer 20 %-igen wässrigen Acroleinlösung.

**Abtrennung des Ionenaustauschers und nicht umgesetzten Acroleins:**

Das Polyaminharz wird abfiltriert, da es den Hydrierkatalysator deaktiviert. Acrolein wird bei Temperaturen unter 80°C vakuumdestilliert, stabilisiert und dann in den Prozess zurückgeführt. Die 3-HPA-Lösung wird vor der Hydrierung mit Hilfe von Dünnschichtverdampfern aufkonzentriert.

**Hydrierung:**

3-HPA wird bei pH 6 über Ru-Katalysatoren auf oxidischen Trägern hydriert.

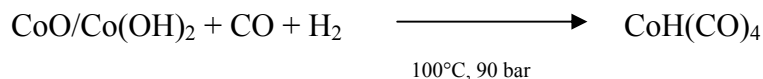
**Rektifikation:**

In einer ersten Kolonne wird Wasser abgetrennt und in einer zweiten Kolonne wird das Produkt 1,3-Propandiol über Kopf abgezogen.

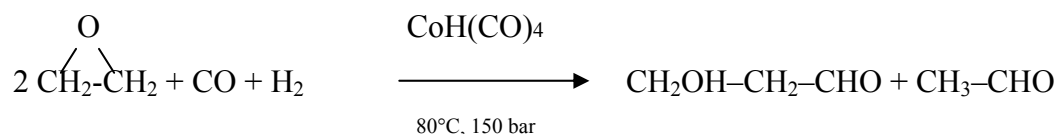
Die Vorteile des Verfahrens sind niedrige Rohstoff- und Energiekosten (Grothe, 2000). Die Nachteile liegen in seiner geringen Spezifität: Neben 1,3-Propandiol entsteht auch 1,2-Propandiol. Die Ausbeuten sind mit ca. 45 % relativ gering (Ullmann, 1993; Menzel, 2000).

**2.3.2.1.2 Shell Prozess: Hydroformylierung von Ethylenoxid zu 3-HPA**

Der Shell-Prozess zur Herstellung von 1,3-Propandiol (Lam *et al.*, 1997) beinhaltet nach Grothe (2000) folgende Schritte:

**Herstellung eines Cobaltkatalysators in Methyl-tert-butylether aus Cobaltsalzen (CoII)**

**Hydroformylierung mit Synthesegas**, ( $\text{H}_2:\text{CO} = 5:1$ ) in MTBE:

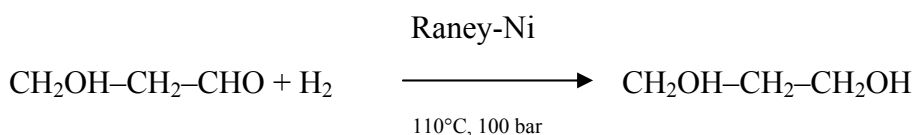


80 % des eingesetzten Ethylenoxids werden mit  $r = 30 \text{ h}^{-1}$  zu 3-Hydroxypropanal (3-HPA) umgesetzt. Die erzielte 3-HPA-Konzentration beträgt ca. 7 Gew.-%. Hohe Drücke und kurze Verweilzeiten begünstigen die Selektivität der Hydroformylierung.

**Wässrige Extraktion von 3-HPA aus der organischen Phase (40°C, 7 bar)**

Die Wassermenge wird so eingestellt, dass die 3-HPA-Konzentration in der Wasserphase über 35 % beträgt. Der Cobaltkatalysator wird mit der Raffinatphase vollständig in den zweiten Prozessschritt zurückgeführt.

**Hydrierung:**



Unter schwach sauren Bedingungen wird 3-HPA vollständig zu PD hydriert. Dieser wird wie im Degussa-Prozess (Kapitel 2.3.2.1.1) beschrieben rektifiziert.

Die Vorteile des Verfahrens sind hohe Ausbeuten und gute Recyclingraten des eingesetzten Cobaltkatalysators. Durch den Einsatz eines asymmetrischen Edukts entsteht bei der Hydroformylierung ausschließlich 3-HPA. Den Vorteilen gegenüber stehen jedoch hohe Rohstoff- und Energiekosten (Grothe, 2000).

### 2.3.2.2 Biotechnologische Verfahren: 3-HPA als Intermediat

#### 2.3.2.2.1 Mikrobielle 1,3-Propandiolherstellung aus Glycerin

Es gibt einige wenige Bakterienarten, die in der Lage sind, 1,3-Propandiol aus Glycerin zu fermentieren. Dazu gehören Arten der Gattungen *Klebsiella* (Abeles *et al.*, 1960), *Citrobacter* (Toraya und Fukui, 1980), *Lactobacillus* (Schütz und Radler, 1984), *Enterobacter* (Barbirato *et al.*, 1996) und *Clostridium* (Biebl *et al.*, 1999). Gut untersuchte und produktionsrelevante Stämme finden sich allerdings nur bei den Arten *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* und *Clostridium butyricum*. Die bei der Fermentation dieser Stämme erreichten Leistungen sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Vergleich der produktionsrelevanten Stämme der fermentativen 1,3-Propandiolproduktion aus Glycerin, modifiziert nach Hartlep (2006).

Stamm	Fermentation	$c_{PD}$ [g/l]	$Y_{PD/Gly}$ [mol/mol]	$Q_{PD}$ [g/lh]	Referenz
<i>K. pneumoniae</i>	kontinuierlich	48,5	0,63	4,9	Menzel <i>et al.</i> (1997); Tag (1990)
	Batch	57,7	0,56	2,4	Tag (1990)
	Fed-Batch	73,3	0,48	1,5	Held (1996)
	Fed-Batch	78,0	0,41	1,6	Hartlep (2000)
	Fed-Batch	83,5	0,5	1,46	Hartlep (2006)
<i>C. freundii</i>	kontinuierlich	16,4	0,57	8,2	Pflugmacher u. Gottschalk (1994)
	batch	25,9	0,48	0,8	Gottschalk und Averhoff (1990)
	batch	35,0	0,65	1,4	Homann <i>et al.</i> (1990)
<i>C. butyricum</i>	batch	56,0	0,62	1,9	Biebl <i>et al.</i> (1992)
	Fed-Batch	58,0	0,68	2,7	Günzel <i>et al.</i> (1991)
	Fed-Batch	70,4	0,68	1,4	Reimann und Biebl (1996)
	Fed-Batch	70,6	0,66	0,8	Abbad-Andaloussi <i>et al.</i> (1995)
	Fed-Batch	86,6	0,67	1,49	Hartlep (2006)

Die übliche Methode, das binäre Gemisch 1,3-Propandiol und Wasser, bzw. das tertiäre Gemisch 1,3-Propandiol, Glycerin und Wasser zu trennen, ist nach wie vor die Verdampfung des Wassers mit nachfolgender Rektifikation des 1,3-Propandiols (Sanz *et al.*, 2001). Allerdings müssen hierzu erhebliche Mengen an Wärme aufgewendet werden, da 1,3-Propandiol meist stark verdünnt in Wasser vorliegt. Außerdem haben Glycerin (Sdp: 290°C) und 1,3-Propandiol (Sdp: 214°C) ähnlich hohe Siedepunkte. Grothe (2000) gibt die Energiemenge der Verdampfung bzw. der Rektifikation für eine reale Fermentationsbrühe von *C. butyricum* mit 30 GJ/tPD bzw. 7,4-7,7 GJ/tPD an. VLE (Vapor liquid equilibria - Flüssigkeit-Dampf-Gleichgewicht)-Daten für das tertiäre Gemisch 1,3-Propandiol, Glycerin und Wasser finden sich bei Sanz *et al.* (2001). Tabelle 2.6 zeigt die physikalischen Eigenschaften noch einmal zusammengefasst auf.

Tabelle 2.6: Ausgewählte physikalische Eigenschaften von 1,3-Propandiol.

Eigenschaft	Wert	Autor
Molgewicht [g/mol]	76,11	
Schmelzpunkt [°C]	-32; -27	Ullmann (1993) CD Römpf (1995)
Siedepunkt [°C] (101,3 kPa)	214	CD Römpf (1995)
Mischbarkeit	mit Wasser, Alkoholen, Ether, Formamid, weniger mit Benzol und Chloroform	Ullmann (1993)
Dichte $d^{20}$ [g/l]	1,0554	Ullmann (1993)
Brechungsindex	1,4389	Ullmann (1993)

Auf Grund des hohen Energiebedarfs bei Verdampfung und Rektifikation wurde nach weiteren Methoden zur Aufreinigung von 1,3-Propandiol gesucht. Tabelle 2.7 gibt einen Überblick über die in der Literatur vorgeschlagenen Verfahren. Vor allem auch die neue Trennaufgabe des quartären Gemisches 1,3-Propandiol, Glucose, Glycerin und Wasser (2.3.2.2.3) ist von Bedeutung, da sich Glucose schlecht thermisch aufarbeiten lässt.

Tabelle 2.7: Aufbereitungsverfahren von 1,3-Propandiol (Xiu und Zeng, 2008).

Methoden	Nachteile	Autor
<b>Verdampfung/ Destillation/ Rektifikation</b>	Hoher Energieverbrauch	Kretschmann (1993); Sanz <i>et al.</i> (2001); Ames (2002);
<b>Adsorption/ Desorption</b>	Keine ausreichende Effizienz	Schlieker <i>et al.</i> (1992); Corbin und Norton (2001)
<b>Pervaporation</b>	Verfahren muss noch mit Kulturbrühe verifiziert werden	Ohlrogge (1992); Li <i>et al.</i> (2001 a, b, c; 2002)
<b>Extraktion</b>	Kein effizientes Extraktionsmittel	Malinowski (1999); Xiang <i>et al.</i> (2001); Baniel <i>et al.</i> (2004); Cho <i>et al.</i> (2006)
<b>Reaktivextraktion</b>	Aufwendig, geringe Effizienz	Broekhuis <i>et al.</i> (1994; 1996); Malinowski (2000); Hao <i>et al.</i> (2005; 2006)
<b>Chromatographie</b>	Aufwendig, hoher Energiebedarf	Hilaly und Binder (2001); Roturier <i>et al.</i> (2002); Corbin und Norton (2003); Adkesson <i>et al.</i> (2004); Wilkins (2004); Cho <i>et al.</i> (2006)
<b>Simulated Moving Bed</b>	Nicht für großtechnische Anwendung ausgearbeitet	Hilaly und Binder (2001)

Jedoch wurden bisher keine wirklich überzeugenden Alternativen zur thermischen Aufreinigung von 1,3-Propandiol gefunden, da die alternativen Methoden (Tabelle 2.7) bisher im Ertrag und der Effizienz limitiert bzw. ungenügend ausgearbeitet sind (Xiu und Zeng, 2008). Insofern stellt die Aufreinigung von 1,3-Propandiol auch weiterhin eine technologische Herausforderung im Hinblick auf eine effiziente mikrobiologische 1,3-Propandiol-Produktion dar.

#### 2.3.2.2.2 Stoffwechselwege der Glycerinvergärung bei *K. pneumoniae*

Die Mechanismen des Glycerinabbaus bei *K. pneumoniae* waren bereits 1960 im Wesentlichen aufgeklärt (Magasanik *et al.*, 1953; Abeles *et al.*, 1960). *K. pneumoniae* ist sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen in der Lage Glycerin zu verwerten. Je nach vorliegenden Bedingungen benutzt der Organismus verschiedene Wege zur Glycerinmetabolisierung (Forage und Foster, 1982). Siehe hierzu Abbildung 2.11. Beide Wege, das glp- und das dha-System, machen das Glycerin über einen Glycerin-Facilitator für die Zelle zugänglich.

Unter aeroben Bedingungen wird je nach limitierendem Faktor ( $\text{NH}_4^+$ , Glycerin,  $\text{PO}_4^-$ ) sowohl das glp-, als auch das dha-System für die Umsetzung des Glycerins verwendet. Unter anaeroben Bedingungen wird nur das dha-System verwendet (Menzel, 2000, Abbildung 2.11).

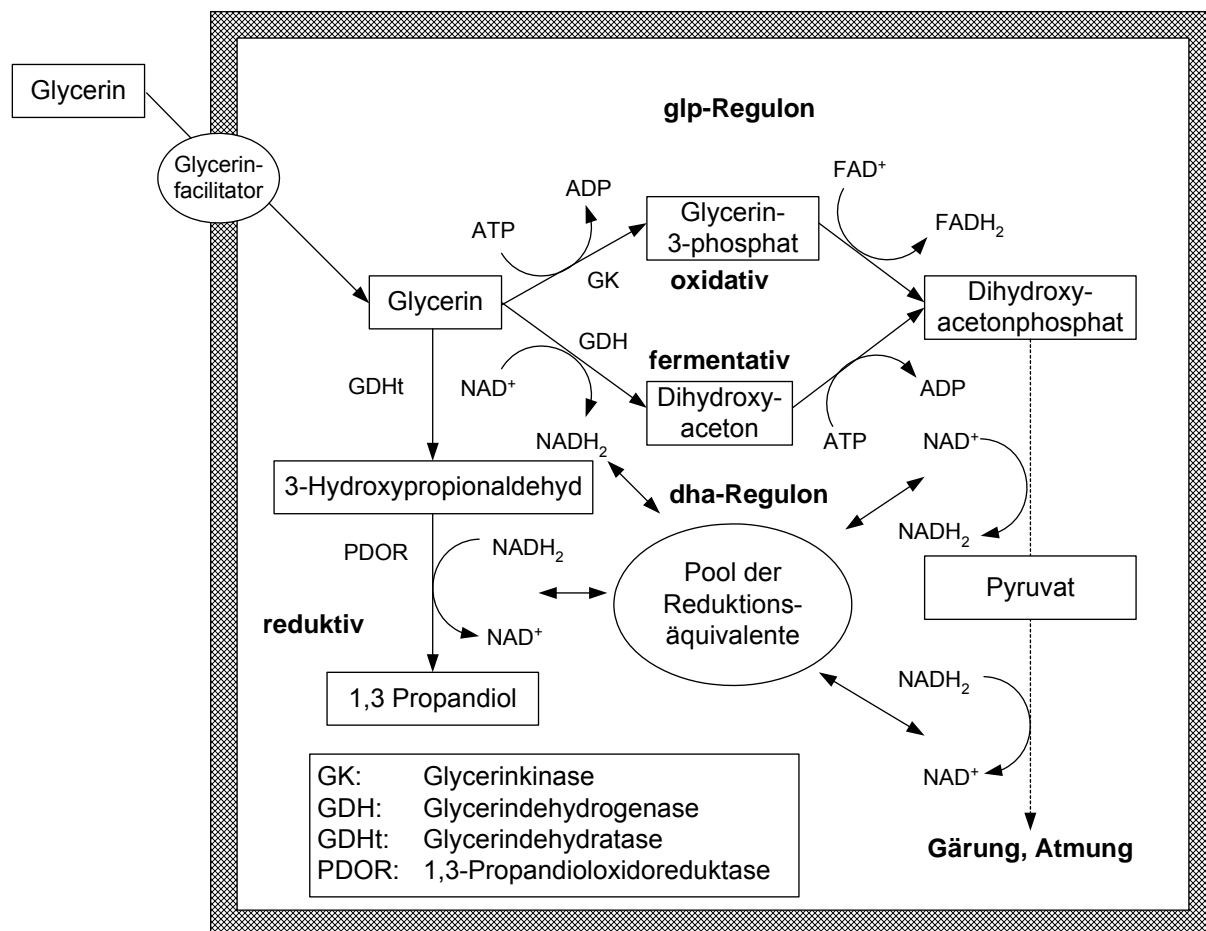


Abbildung 2.11: Glycerin-Aufnahme und Wege des anaeroben und aeroben Katabolismus in *K. pneumoniae*.

Unter anaeroben Bedingungen wird Glycerin in zwei Wegen metabolisiert. Der für die Bildung von ATP und somit für den Biomasseaufbau wichtige oxidative Weg führt über die Bildung von Dihydroxyaceton und Dihydroxyacetonphosphat weiter in den für *Enterobacteriaceae* typischen Gärungsstoffwechsel (Abbildung 2.12). Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente ( $\text{NADH}_2$ ) werden im reduktiven Weg regeneriert. Dabei wird Glycerin zuerst unter Abspaltung von Wasser durch das Vitamin  $\text{B}_{12}$ -abhängige Enzym Glycerindehydratase (GDHt) in 3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) überführt (Kapitel 2.4.1). Die Hydrierung des 3-HPA und die gleichzeitige Regeneration von  $\text{NADH}_2$  erfolgt durch die Propandioloxidoreduktase (PDOR, Kapitel 2.4.2)

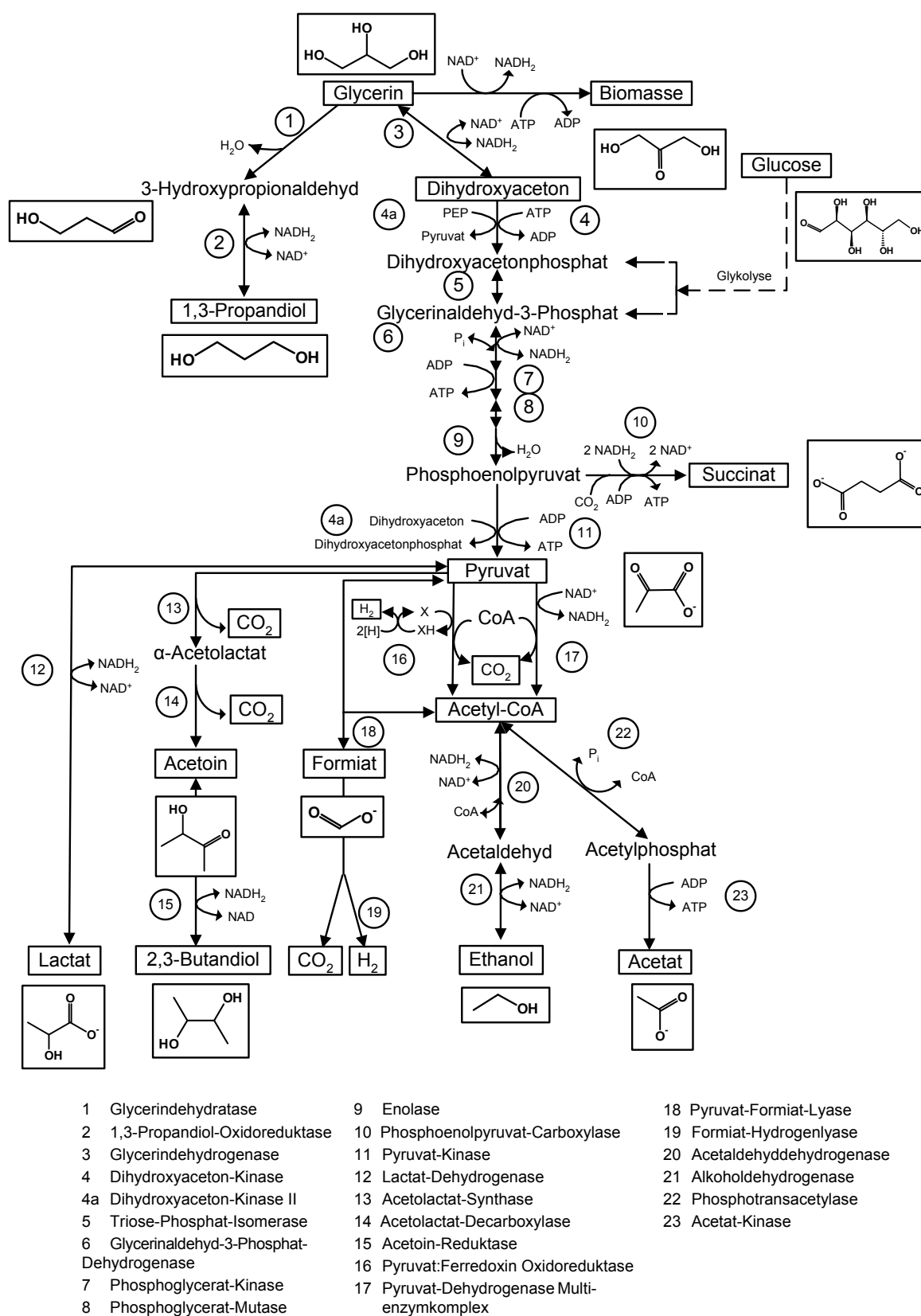


Abbildung 2.12: Diagramm des anaeroben Glycerin Metabolismus von *K. Pneumoniae* (Streekstra et al., 1987; Sun et al., 2003). Die Reversibilitätsinformationen wurden nach den Regeln von Ma und Zeng (2003) eingefügt, zusätzliche Informationen wurden aus den Datenbanken KEGG (Kanehisa et al., 2006) und BRENDA (Schomburg et al., 2004) erhalten.

Die dissimilatorischen Regulationsmechanismen bezüglich der Verstoffwechselung verschiedener Substrate sind gut dokumentiert, sowohl für die Glycerininduktion als auch für die Glucoserepression der Enzyme des *glp*- und *dha*-Regulons (Magasanik und Neidhardt, 1956; Neidhardt und Magasanik, 1957; Lin *et al.*, 1960; Ruch und Lin, 1975; Toraya *et al.*, 1978; Forage und Foster, 1979; Forage und Lin, 1982). Bei Vorliegen von Glucose tritt eine Katabolitrepression (Glucoseeffekt) auf, d.h. Enzyme, die für die Umsetzung von Glycerin verantwortlich sind, werden reprimiert (Magasanik und Neidhardt, 1956).

#### 2.3.2.2.3 1,3-Propandiolherstellung aus Glucose

Nicht unerhebliche Anstrengungen wurden von DuPont in Zusammenarbeit mit der Firma Genencor unternommen, mittels genveränderten Mikroorganismen (GMO) 1,3-Propandiol zu produzieren. Auch hier wird 1,3-Propandiol über das Intermediat 3-HPA produziert. Dabei wird als Ausgangssubstrat Glucose bzw. Stärke verwendet. Da natürliche 1,3-Propandiol-produzierende Mikroorganismen nicht in der Lage sind, Glucose direkt in 1,3-Propandiol umzusetzen, wurden mehrere Gene aus *Saccharomyces cerevisiae* (DAR1 + GPP2) und *K. pneumoniae* (*dhaB1-3*, *dhaBX*, *orfX*) in einen aerob wachsenden Mikroorganismus (*E. coli*) kloniert (Abbildung 2.13). Wichtigster Innovationsschritt war das Knockout des PTS-Systems und die Verminderung der Expression der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gap*) (Nakamura und Whited, 2003).

Dieser Prozess wurde ausgiebig patentiert (Nagarajan und Nakamura, 1996; Laffend *et al.*, 1996; Haynie und Wagner, 1996; Bulthuis *et al.*, 1998; Dunn-Coleman *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1999; Whited *et al.*, 1999; Trimbur *et al.*, 2000; Emptage *et al.*, 2001; Bulthuis *et al.*, 2002). Dabei wurden 1,3-Propandiol-Konzentrationen von bis zu 135 g/l mit einer Produktionsrate von 3,5 g/l h (Emptage *et al.*, 2001; Nakamura und Whited, 2003; Chotani *et al.*, 2000) und einer Ausbeute von 72 % des theoretischen möglichen Wertes erreicht (Burgard *et al.*, 2003). Die Firma DuPont baute zusammen mit Tate & Lyle PLC in Loudon, Tennessee, die größte aerobe Fermentationsanlage weltweit, die für die Produktion von 1,3-Propandiol mit einer Kapazität von 45000 tPD/a ausgelegt ist (Chynoweth, 2006). Sie sollte Ende 2006 den Betrieb aufnehmen (DuPont, 2006) und soll jetzt in Betrieb sein (DuPont, 2007). Da die Glycerindehydratase (GDHt) aus *Klebsiella pneumoniae* Vitamin B<sub>12</sub>-abhängig ist (Kapitel 2.4) und dieses von *E. coli* nicht gebildet werden kann, muss während der Fermentation in nicht unerheblichem Maße Vitamin B<sub>12</sub> zugeben werden, der genetisch veränderte Mikroorganismus benötigt daher ein aktives Aufnahmesystem für Vitamin B<sub>12</sub> (Abbildung 2.13). Ein weiteres Problem stellt sicherlich die Aufreinigung dar; Glucose ist nicht ohne weiteres rektifizierbar.



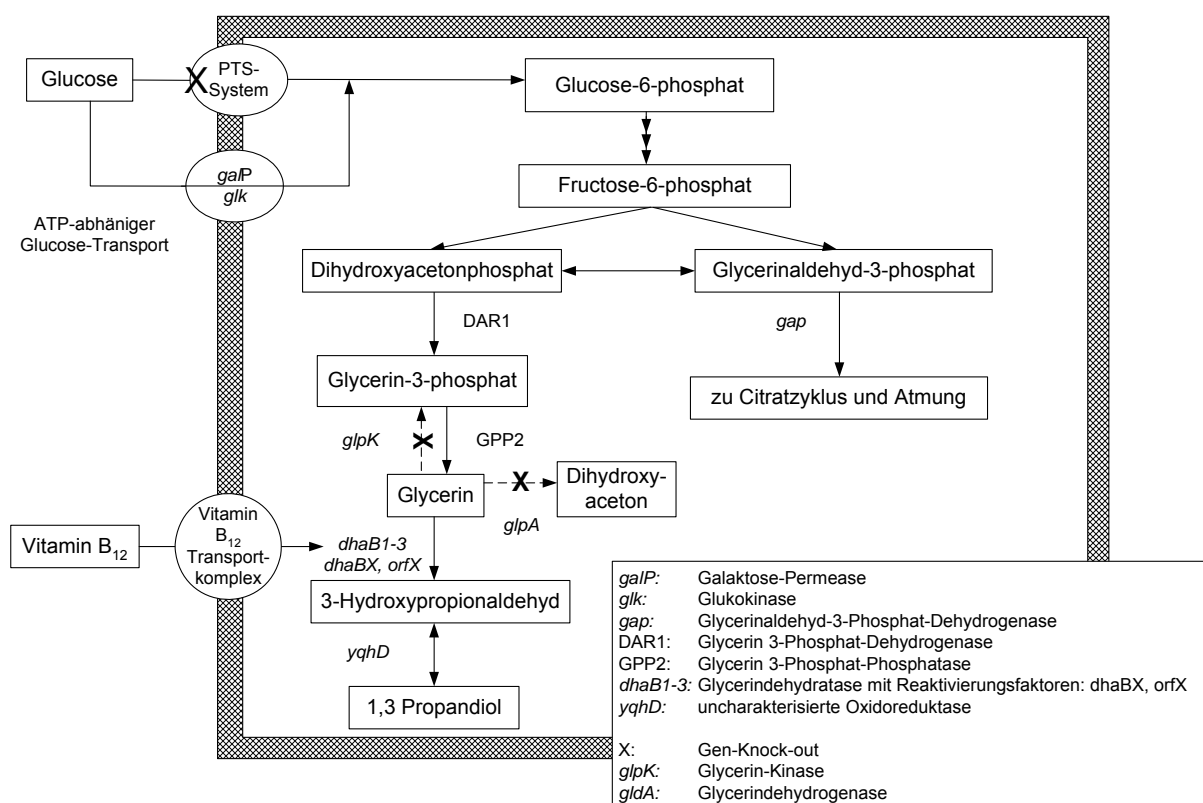


Abbildung 2.13: Stoffwechsel des GMO's zur Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glucose (Chotani et al., 2000; Emptage et al., 2001; Nakamura und Whited, 2003).

Glucose kann auch direkt in 3-Hydroxypropionsäure umgesetzt werden, was in Kapitel 2.3.3 ausführlich beschrieben wird.

#### 2.3.2.2.4 Wirtschaftlicher Vergleich der verschiedenen Produktionsverfahren für 1,3-Propandiol

Nach Grothe (2000) sind bei gleicher Anlagengröße die Produktionskosten für 1,3-Propandiol bei den biotechnologischen Verfahren nur geringfügig teurer als bei den chemischen Verfahren. Hierbei wurden die Produktionskosten bei einer Anlagengröße von 65000 T/a verglichen. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass sich der Preis für Rohöl in den letzten Jahren von 30 \$/Barrel (Vollenweider und Lacroix, 2004) auf 100 \$/Barrel (Spiegel Online, 2008) mehr als verdreifacht hat, während der Glycerinpreis in dieser Zeit von 1100 \$/t (Rada et al., 1986) auf 540 \$/t (Cooper, 2006) auf mehr als die Hälfte gesunken ist (Kapitel 2.3.1).

Somit haben sich die chemischen Verfahren stark verteuert und ein weiterer Anstieg des Ölpreises scheint sehr wahrscheinlich. Daher werden die biotechnologischen Verfahren in Zukunft eher konkurrenzfähiger. Jedoch kann eine Preiskopplung von nachwachsenden Rohstoffen an den Ölpreis durchaus postuliert werden (Nordhoff, 2007), d.h. bei steigendem Ölpreis

werden auch die nachwachsenden Rohstoffe teurer. Jedoch muss die Rohstoffquelle im Einzelfall betrachtet werden und speziell der Preis für den Rohstoff Glycerin wird langsamer steigen (Kapitel 2.3.1). Alle biotechnologischen Produktionsprozesse für 1,3-Propandiol zeichnen aus, dass der weitaus größte Anteil der Kosten durch die Edukt- bzw. Substratkosten entsteht. Für die Glycerinvergärung sind 51,6 % der Gesamtkosten die Kosten für das Substrat Glycerin bei einem postulierten Preis von 400 €/t, gefolgt von den Dampfkosten mit 7,7 % (Grothe, 2000). Ein Verfahren, das möglichst selektiv und ohne Nebenreaktionen bzw. -produkte abläuft, würde eine weitere Verminderung der Produktionskosten bedeuten.

### 2.3.2.3 Biotechnologische Verfahren: 3-HPA als Endprodukt

3-HPA ist ein Intermediat des reduktiven Metabolismus in einer Reihe von Bakterien, z.B. in *Enterobacteriaceae* (Kapitel 2.3.2.2.2). Eine Akkumulation von 3-HPA ist für den wachsenden Organismus jedoch toxisch (Sobolov und Smiley, 1960; Talarico *et al.*, 1988; Barbirato *et al.*, 1996).

Wie einleitend bereits erwähnt wurden bisher zwei verschiedene Verfahren angewendet, um diese Toxizität zu vermeiden und die Ausbeute des Prozesses zu steigern:

Die erste Methode benutzt *L. reuteri* als Produktionsstamm. 3-HPA kann in Gegenwart von Glucose und Glycerin heterofermentativ produziert werden (Talarico *et al.*, 1988). Allerdings lassen sich höhere Produktkonzentrationen mit einem Biotransformationsprozess erreichen (Vollenweider *et al.*, 2003). Hierbei wird zuerst Biomasse in einer Fermentation gewonnen, die dann zur Produktion von 3-HPA in wässrige Glycerinlösung verbracht wird (Tabelle 2.8). Der Stamm und das Produkt Reuterin (zyklisches, dimeres 3-HPA) wurden 1988, wie bereits erwähnt, patentiert (Lindgren und Dobrogosz, 1988). Die probiotische Wirkung von *L. reuteri* beruht auf der Exkretion von Reuterin, einer niedermolekularen, pH-neutralen und wasserlöslichen Substanz, die bakterizide, fungizide und protozoide Wirkung aufweist (Tabelle 2.1). Jedoch beruht nach Vollenweider *et al.* (2003) diese Wirkung nicht auf dem Dimer, wie von Lindgren und Dobrogosz (1988) angegeben, sondern auf den monomeren Formen 3-HPA-Hydrat und 3-HPA (Abbildung 2.1). *L. reuteri* wird in mehreren Ländern vor allem in Milchprodukten als probiotischer Organismus eingesetzt (Vollenweider und Lacroix, 2004).

Die zweite Methode benutzt *K. pneumoniae* als Produktionsstamm. Zuerst wird aktive Biomasse in einer Glycerinfermentation gewonnen, die dann zur Produktion von 3-HPA in eine gepufferte Semicarbazidlösung verbracht wird (Tabelle 2.8). Diese Methode beruht auf den Kenntnissen von Abeles *et al.* (1960) und wurde von Slininger und Bothast (Slininger *et al.*,

1983; Slininger und Bothast, 1985; Vancauwenberge *et al.*, 1990) weiterentwickelt und patentiert (Slininger und Bothast, 1990).

Normalerweise wird Glycerin von *K. pneumoniae* unter anaeroben Bedingungen zu 1,3-Propandiol verstoffwechselt, wobei 3-HPA das Zwischenprodukt darstellt. Die maximale Ausbeute an 1,3-Propandiol ist dabei auf einen Wert von 72 % (mol/mol) beschränkt, da ein Teil des Substrates für die Herstellung von Reduktionsäquivalenten benötigt wird, um 3-HPA in 1,3-Propandiol zu reduzieren (Abbildung 2.14).

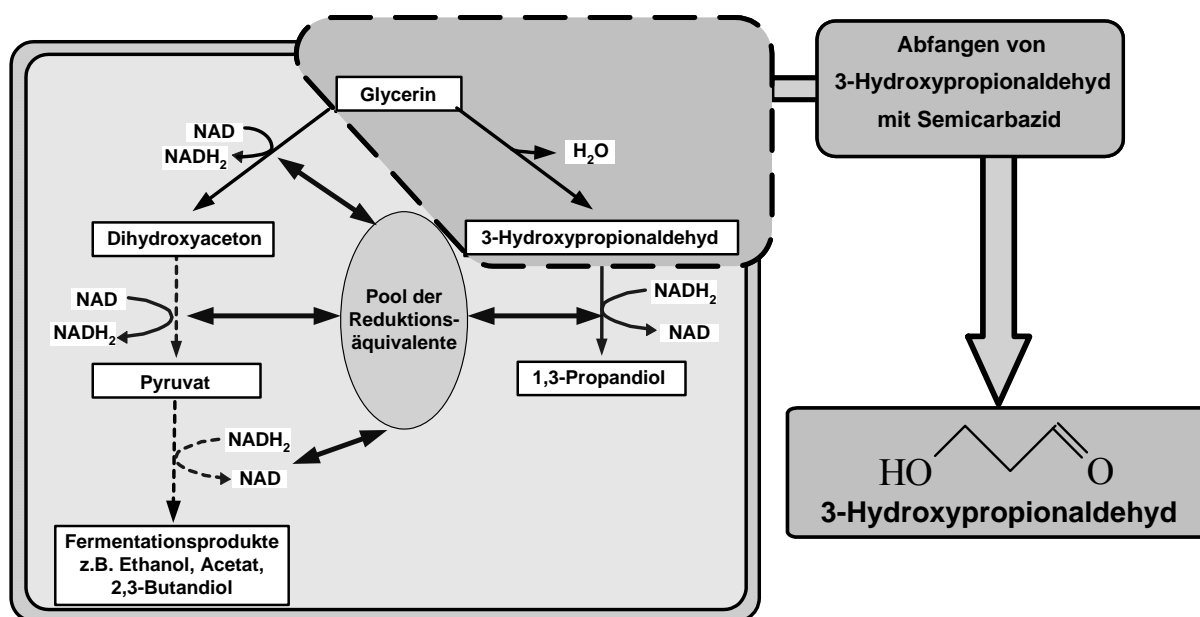


Abbildung 2.14: Abfangen von 3-HPA mit Hilfe von Semicarbazid.

Durch die Verwendung von Semicarbazid kann 3-HPA abgefangen werden. Die weitere Umwandlung zu 1,3-Propandiol wird dann blockiert und die theoretische Ausbeute liegt bei 100 % (mol/mol).

Einen Überblick über die eingesetzten Biomasse- und Glycerinkonzentrationen, wie auch die resultierenden Endkonzentrationen und Ausbeuten der beiden beschriebenen Produktionsverfahren gibt Tabelle 2.8 wieder. Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden zur Tabelle hinzugefügt. Durch das Abfangen von 3-HPA mit Semicarbazid und *K. pneumoniae* als Produktionsstamm können höhere Konzentrationen und Ausbeuten erreicht werden, als mit der Produktionsmethode mit *L. reuteri*. Ulmer und Zeng (2007) konnten aufzeigen, dass mit dieser Methode eine Endkonzentration von 54 g/l 3-HPA bei einer Ausbeute von 97 % (mol/mol) produziert werden kann.

Tabelle 2.8: Biotechnologische Produktion von 3-HPA.

Stamm	BTM	Glycerin	3-HPA	Y <sub>3-HPA/Gly</sub>	Quelle
	[g/l]	[g/l]	[g/l]	[mol/mol]	
<i>L. reuteri</i>	k.A.	27,6	11,1	0,64	Talarico <i>et al.</i> (1988)
<i>L. reuteri</i>	30	18,4	12,6	0,85	Lüthi-Peng <i>et al.</i> (2002)
<i>L. reuteri</i>	k.A.	18,4	12,6	0,85	Vollenweider <i>et al.</i> (2003)
<i>L. reuteri</i>	1,6 10 <sup>10</sup> cfu*	36,8	17,4	0,62	Doleyres <i>et al.</i> (2005)
<i>K. pneumoniae</i>	5	30,0	13,1	0,54	Slininger <i>et al.</i> (1983)
<i>K. pneumoniae</i>	k.A.	30,0	16,9	0,70	Slininger und Bothast (1985)
<i>K. pneumoniae</i>	14,5	70,0	46,0	0,82	Vancauwenberge <i>et al.</i> (1990)
<i>K. pneumoniae</i>	10+4**	51+13**	54,0	0,97	Ulmer und Zeng (2007)

Legende:

- \*cfu = colony-forming units  
 \*\* = zusätzlich zum Reaktionsansatz gegeben  
 k.A. = keine Angaben

**2.3.2.3.1 Aufarbeitung von 3-HPA**

Wie bereits beschrieben, lässt sich 3-HPA nicht so einfach thermisch aufreinigen wie 1,3-Propandiol, eine Destillation ist aber möglich, wenn auch mit geringen Ausbeuten. Tabelle 2.9 gibt die Spezifikationen von 3-HPA-Destillationen aus früheren Veröffentlichungen an.

Tabelle 2.9: Zusammenstellung der Destillationsbedingungen.

Autoren	Siede- punkt [°C]	Druck [mbar]	Destillation		Ausbeute	n <sub>D</sub> <sup>20</sup>	
			einmal	mehrmals		Monomer	Dimer
Hall und Stern (1950)	38	0,27	X		< 20 %	1,4418	1,4783
Nef (1904)	90	24		X	Verlust bei jeder Dest. > 16-25 %	k.A.	k. A
Orsi und Cleland (1972)	74-77	16		X	k.A.	k.A.	k.A.
Ropuszynski und Matyschok (1966)	75-76	16	X		k.A.	1,4401	k.A.
Ogata <i>et al.</i> (1972)	78-82	17,3		X	30 %	1,4485	1,466

Daher wurde nach anderen Methoden zur Aufreinigung gesucht, wobei zwischen den beiden biotechnologischen Produktionsverfahren bzw. je nach weiterer Verwendung von 3-HPA unterschieden werden muss. Zur Aufreinigung von mit *L. reuteri* produziertem 3-HPA wurden vor allem chromatographische Methoden benutzt; jedoch eher analytische mit HPLC (Talarico *et al.*, 1988; Barbirato *et al.*, 1996), semipräparative ebenfalls mit HPLC (Sung *et al.*, 2003) oder eine Aufreinigung über eine Aceton:Ethylacetat-Säule auf einem Silika 60 Support mit

einer relativ geringen Beladung von 30,8 mg 3-HPA pro g Silikagel (Vollenweider *et al.*, 2003). Diese Methoden reichen für eine Aufreinigung zum Einsatz für medizinische Zwecke sicherlich aus, für einen Einsatz als Bulkchemikalie werden jedoch andere Aufreinigungsmethoden benötigt.

Nach Slininger und Bothast (1990) soll zur Aufkonzentration von 3-HPA aus dem Semicarbazidpuffer 3-HPA in sein Semicarbazon überführt werden. Das zellfreie Extrakt soll dabei auf 100 °C erhitzt, dann abgekühlt und die entstehenden Kristalle abgetrennt werden. Danach soll das Semicarbazon mit Säure gespalten werden. Nicht beschrieben wird jedoch, wie das entstandene Semicarbazidhydrochlorid vom freien 3-HPA bzw. Acrolein getrennt werden soll. Die Methode hat den Vorteil, dass die Verdampfungsenergie für die Entwässerung eingespart werden kann. Sie eignet sich jedoch nur, um aus 3-HPA Acrolein zu erstellen, da 3-HPA unter den zur Spaltung des Semicarbazons notwendigen, stark sauren Bedingungen im Gleichgewicht zu Acrolein steht (Kapitel 2.1). Um 3-HPA als Basischemikalie für andere Produkte zu verwenden (Abbildung 2.5), kann diese Aufkonzentrierung bzw. dieser Aufarbeitungsweg nicht genutzt werden.

### **2.3.3 3-Hydroxypropionsäure**

3-Hydroxypropionsäure (3-Hp) kann chemisch beispielsweise mit dem Ethylencyanhydrin-Verfahren produziert werden (Read, 1941). Das heute dominierende Verfahren ist die direkte Oxidation von Propen (CD Römpf, 1995). Biotechnologisch kann es mit Hilfe von gentechnisch veränderten Mikroorganismen aus Glucose gewonnen werden (Suthers und Cameron, 2001; Gokarn *et al.*, 2002.) Mehrere mögliche Wege zur biotechnologischen Produktion mit einem genveränderten *E. coli*-Stamm, ausgehend von Glucose bzw. Phosphoenolpyruvat, werden dabei vorgeschlagen (Abbildung 2.15).

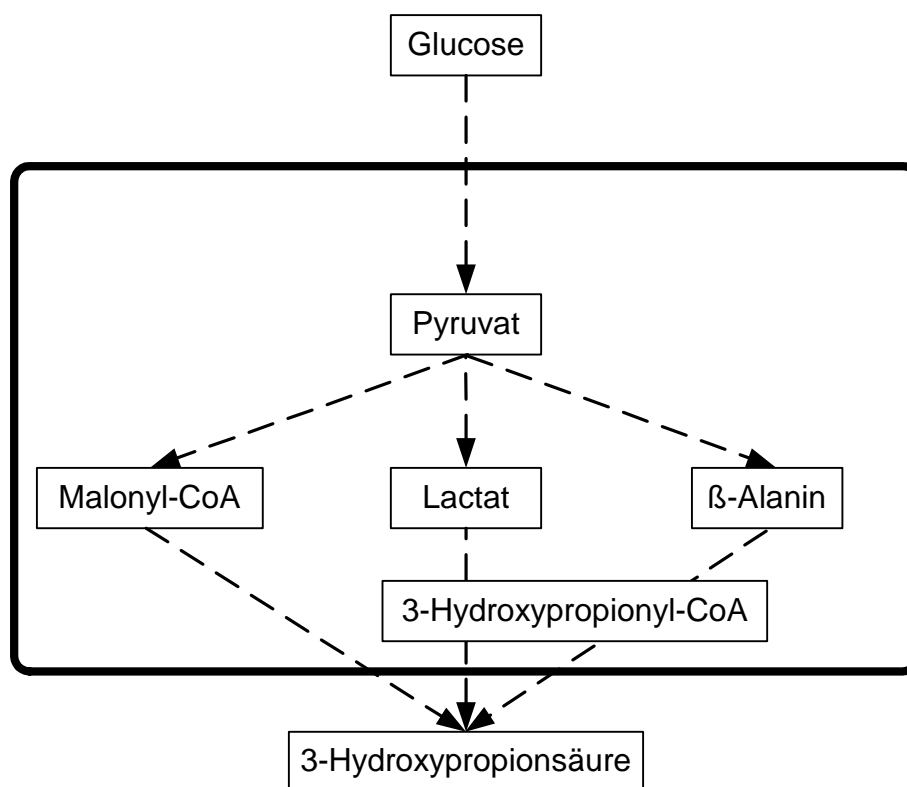


Abbildung 2.15: Mögliche Wege zur Produktion von 3-Hydroxypropionsäure (Gokarn et al., 2002).

Der Fermentationsprozess wurde nicht detailliert beschrieben, jedoch ist die Veresterung von 3-Hp und die folgende Aufarbeitung, sowie die weitere Umsetzung in 1,3-Propandiol patentiert worden (Tsobanakakis *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2005). 3-Hp kann wie 3-HPA in die verschiedenen Folgeprodukte umgesetzt werden (Abbildung 2.5).

Weiterhin wurden verschiedene *Lactobacilli* beschrieben, die durch eine equimolare Disproportionierung aus 3-HPA 1,3-Propandiol und 3-Hp produzieren (Sobolov und Smiley, 1960; Talarico *et al.*, 1988; Magnusson, 2003; Sung *et al.*, 2003).

## 2.4 CHARAKTERISIERUNG WICHTIGER ENZYME FÜR DIE 3-HPA PRODUKTION

Für die Produktion von 3-HPA ist ein gutes Verständnis der Funktionsweise der Glycerindehydratase von entscheidender Bedeutung. Deshalb soll hier verstärkt darauf eingegangen werden. Die Dioldehydratase ist von ähnlicher Funktionalität. Das Folgeenzym des reduktiven Metabolismus von *K. pneumoniae* ist die 1,3-Propandioloxidoreduktase und soll im Folgenden kurz erwähnt werden.

### 2.4.1 Glycerindehydratase/Dioldehydratase

Die Dehydratation von Glycerin zu 3-Hydroxypropionaldehyd kann durch zwei verschiedene Enzyme, der Glycerindehydratase (GDHt) mit der EC-Nummer 1.1.1.202 oder der Dioldehydratase (DDH) mit der EC-Nummer 4.2.1.28 katalysiert werden. Beide Enzyme können entweder einzeln oder gemeinsam in den verschiedenen Mikroorganismen exprimiert werden. Beide Enzyme sind Coenzym B<sub>12</sub>-abhängig, dabei unterscheiden sie sich jedoch in ihrer Affinität zum Coenzym B<sub>12</sub> und der Art ihrer Induktion durch das Substrat.

Beide Enzyme katalysieren die Umsetzung von Glycerin, 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol in die entsprechenden Aldehyde 3-HPA, Propionaldehyd und Acetaldehyd. Die Dioldehydratase wird durch 1,2-Propandiol weitaus stärker induziert als mit Glycerin (Toraya und Fukui, 1977).

#### **Inaktivierung und Reaktivierung der Glycerindehydratase/Dioldehydratase**

Für die Umsetzung von Glycerin zu 3-HPA ist vor allem die Dehydratase-Aktivität von Bedeutung. Dieser Abschnitt gibt eine Zusammenfassung der Faktoren, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen:

- Die Glycerindehydratase wird durch Sauerstoff, Glycerin und bei einem pH > 8 irreversibel inaktiviert (Schneider *et al.*, 1970).
- Die GDHt wird *in vitro* irreversibel durch ihr Substrat Glycerin inaktiviert (Schneider und Pawelkiewicz, 1966; Toraya *et al.*, 1976; Poznsanskaya *et al.*, 1977; Bachovchin *et al.*, 1977).
- Die Umsetzung von Glycerin wird durch Kationen gesteigert: NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > K<sup>+</sup> (Forage und Foster, 1979). Die Inaktivierung der GDHt erfolgt dann erst nach einer Zeitspanne von 15 min.
- Die Inaktivierung erfolgt auch durch Sauerstoff in Abwesenheit von Substrat (Poznsanskaya und Yakusheva, 1979).
- Eine Reaktivierung der GDHt ist durch Zugabe von Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>, ATP und Adenosylcobalamin (Coenzym B<sub>12</sub>) *in situ* (durch Toluol permeabilisierte Zellen) möglich, jedoch nicht *in vitro* (Honda *et al.*, 1980).

Im Gegensatz zu Finlay *et al.* (1972) und Honda *et al.* (1980) schlagen Ushio *et al.* (1982) den folgenden Mechanismus der Reaktivierung der GDHt vor. Bei der Reaktivierung mit

$\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ , ATP und Adenosylcobalamin bleibt nicht, wie zunächst vermutet, das Coenzym am Apoenzym gebunden, sondern wird vollständig aus dem Apoenzym gelöst.

Für die Reaktivierung *in situ* ist nach neueren Erkenntnissen außer ATP und  $\text{Mg}^{2+}$  ein Reaktivierungsfaktor, bestehend aus den Genprodukten GdrA und GdrB ( $\text{GdrA}_2\text{GdrB}_2$ ), nötig (Kajiura *et al.*, 2001; Tobimatsu *et al.*, 1999). Der Reaktivierungsfaktor vermittelt den ATP-abhängigen Austausch von enzymgebundenem, Adenin-freiem Cobalamin mit freiem Adenosylcobalamin (AdoCbl) durch die intermediäre Bildung von Apoenzym in Gegenwart von ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  und Adenosylcobalamin (Abbildung 2.16).

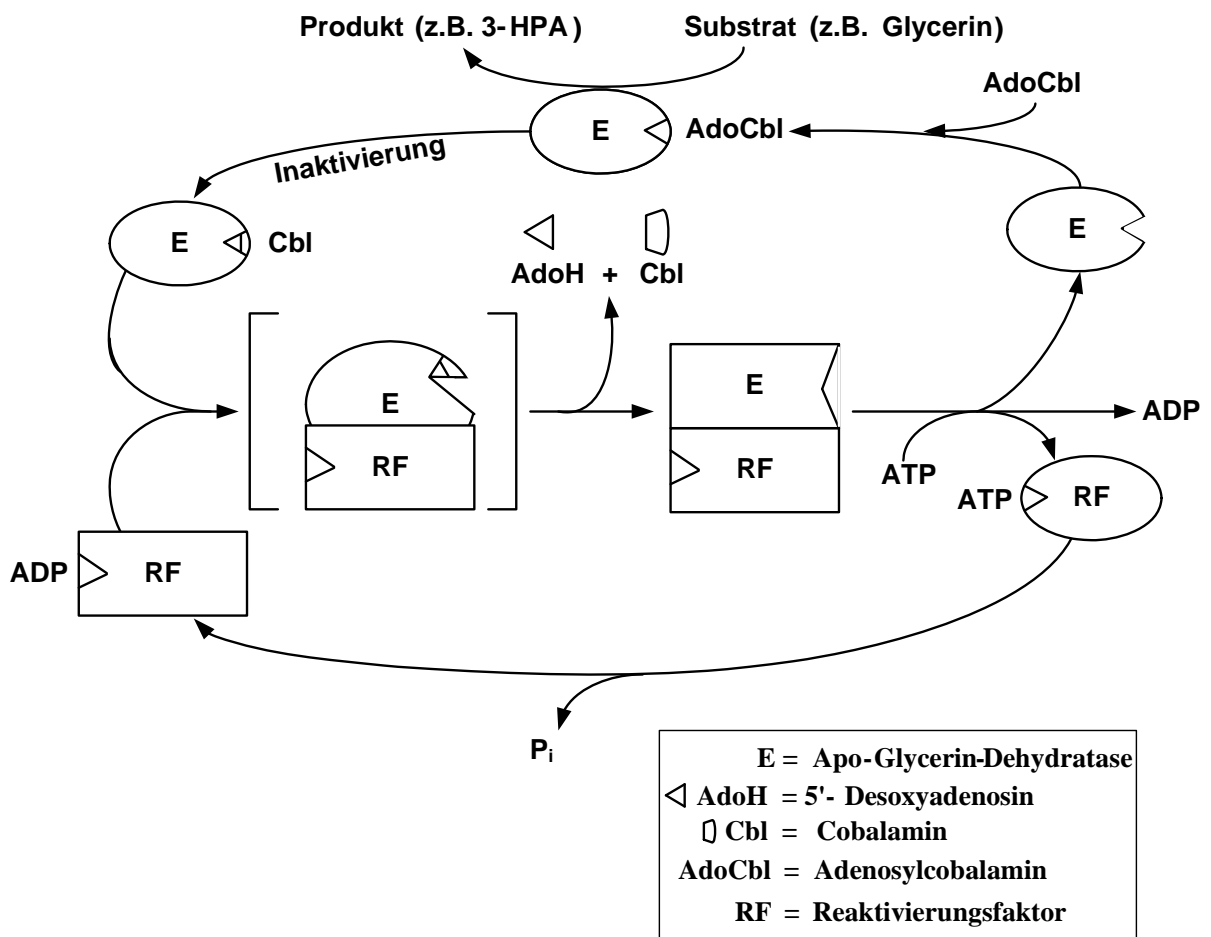


Abbildung 2.16: Vorgeschlagener, zweistufiger Mechanismus zur Reaktivierung der GDHt durch einen Reaktivierungsfaktor nach Kajiura *et al.* (2001).



Es wird ein zweistufiger Mechanismus vorgeschlagen (Kajiura *et al.*, 2001): An den Reaktivierungsfaktor gebundenes ATP wird zu ADP hydrolysiert, welches eine Konformationsänderung des Reaktivierungsfaktors von einer Form mit einer geringen Affinität in eine Form mit hoher Affinität für das deaktivierte Holoenzym veranlasst (Abbildung 2.16 - unten). Durch Komplexbildung des aktivierten Reaktivierungsfaktors (ADP-Form) mit dem inaktivierten Holoenzym wird das inaktivierte, modifizierte Coenzym (AdoH+Cbl) vom Apoenzym-Reaktivierungsfaktor-Komplex gelöst (Abbildung 2.16 - Mitte). Durch Bindung von ATP wird der Reaktivierungsfaktor in seine Form mit geringer Affinität zurückgeführt und der Apoenzym-Reaktivierungsfaktor-Komplex gelöst. Das freie Apoenzym kann durch die Zugabe von Adenosylcobalamin (AdoCbl) zu aktivem Holoenzym zurückgeführt werden, während der Reaktivierungsfaktor wieder in den Reaktivierungszyklus durch Hydrolyse von ATP zurückkehrt.

Der Wirkungsmechanismus eines Reaktivierungsfaktors wurde zuerst für die Dioldehydratase aufgeklärt (Mori *et al.*, 1997 a, b; Tobimatsu *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2002, 2005; Kamachi *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005). *In situ* kann dieser aus den Genprodukten DdrA und DdrB ( $A_2B_2$ ) aufgebaute Reaktivierungsfaktor auch die GDHt reaktivieren, während dies mit dem Reaktivierungsfaktor der GDHt nicht möglich ist. Dies deutet auf einen ähnlichen, jedoch nicht gleichen Mechanismus hin (Kajiura *et al.*, 2001). Abbildung 2.17 veranschaulicht die Reaktivierung der Dioldehydratase. Cobalamin wird durch Reduktase- und ATP-Hydrolaseaktivität reaktiviert (Toraya, 2000).

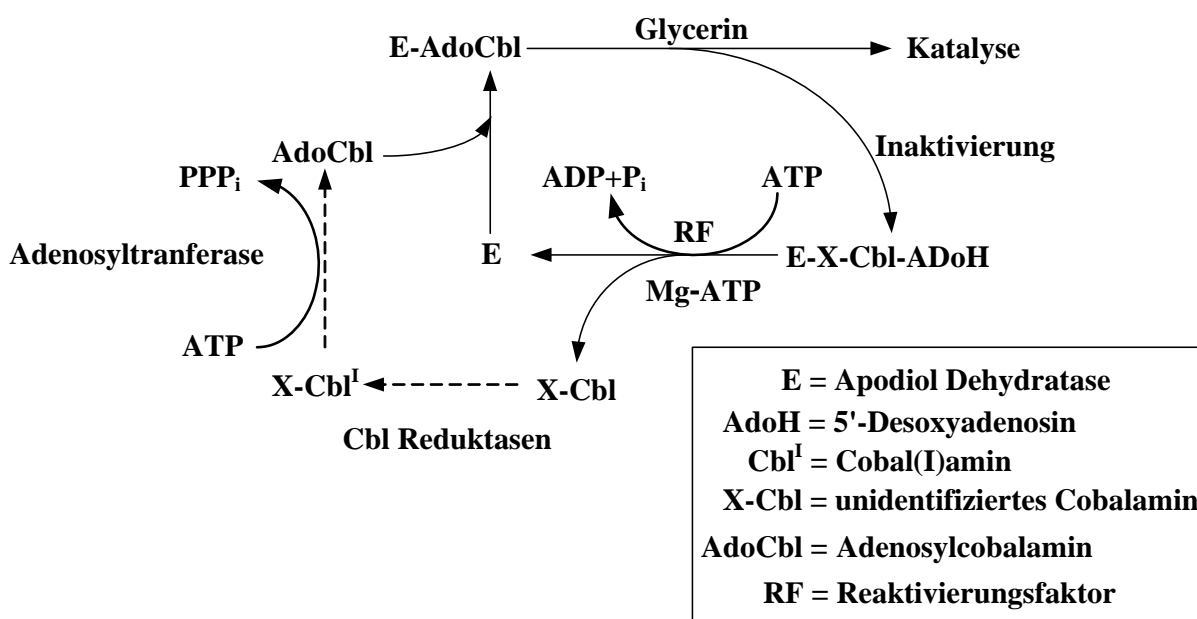


Abbildung 2.17: Zweistufiger Mechanismus zur Reaktivierung der Dioldehydratase nach Toraya (2000).

Eine B<sub>12</sub>-unabhängige Glycerindehydratase wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Soucaille bei Clostridien gefunden (Sarcabal *et al.*, 2001; Raynaud *et al.*, 2003). Allerdings unterliegt auch diese GDHt einem Inaktivierungsmechanismus *in vitro*.

#### **2.4.2 1,3-Propandiol-Oxidoreduktase**

Die 1,3-Propandiol-Oxidoreduktase (PDOR) mit der EC-Nummer 1.1.1.202 katalysiert die Reduktion von 3-HPA zum 1,3-Propandiol unter gleichzeitiger Regeneration von Reduktionsäquivalenten (Abbildung 2.12). Nach Schneider und Pawelkiewicz (1966) wird die PDOR durch NADH<sub>2</sub> und NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Ionen aktiviert, durch NAD, 1,3-Propandiol und Sauerstoff inhibiert.

---

### 3 MATERIAL UND METHODEN

---

#### 3.1 STAMM

Für die Versuche wurde hauptsächlich *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 verwendet. Dieser Stamm wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

Für den Versuch mit *Clostridium* wurde *C. butyricum* VPI 1718 verwendet. Dieser Stamm wurde von dem Institut National des Sciences Appliquées (INSA) aus Toulouse (Frankreich) bezogen.

#### 3.2 STAMMHALTUNG

Die Stammhaltung erfolgte mittels Gefrierkultur. Dazu wurde eine Kultur (Vorkulturmedium) 1:1 mit 99 %-igem Glycerin versetzt, in Kryoröhrchen abgefüllt und bei –70 °C aufbewahrt.

Für jede neue Fermentation wurde ein Röhrchen aufgetaut und als Inoculum für die Vorkultur verwendet.

#### 3.3 MEDIEN

Sämtliche Medien wurden vor dem Inokulieren bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Für die Vorkulturen (50 ml) wurden Erlenmeyerkolben (250 ml) und Anaerobenflaschen (100 ml) benutzt. Das Medium in den anaeroben Flaschen wurde unter Stickstoff-Begasung aufgeköcht, in die Anaerobenflaschen pipettiert und anschließend nochmals mit Stickstoff gespült.

Das Vorkulturmedium (pH 7,2) ist gegenüber dem Fermentationsmedium stärker gepuffert, da hier der pH nicht extern geregelt wurde.

### 3.3.1 Vorkulturmedium

Das Basismedium des Vorkulturmediums (VK) wurde, wie in Tabelle 3.1 gezeigt, angesetzt.

Tabelle 3.1: Basismedium nach Homann et al. (1990.)

<b>Basismedium (VK):</b>			
	Glycerin	20,0	[g/l]
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,4	[g/l]
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3	[g/l]
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0	[g/l]
	CaCO <sub>3</sub>	2,0	[g/l]
	Hefeextrakt (DIFCO)	1,0	[g/l]
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2	[g/l]
	Calciumchloridlösung	1,0	[ml/l]
	Eisensulfatlösung	1,0	[ml/l]
	Spurenelement-Lösung VK	2,0	[ml/l]

<b>Calciumchloridlösung (VK):</b>			
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,0	[g/l]

<b>Eisensulfatlösung (VK):</b>			
	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	5,0	[g/l]
	HCl (konzentriert)	4,0	[ml/l]

<b>Spurenelement-Lösung (VK):</b>			
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	200	[mg/l]
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	100	[mg/l]
	ZnCl <sub>2</sub>	70	[mg/l]
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60	[mg/l]
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	35	[mg/l]
	NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	25	[mg/l]
	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	20	[mg/l]
	HCl (konzentriert)	0,9	[ml/l]

### 3.3.2 Fermentationsmedium

Dem Fermentationsmedium (FM) nach Evans (1970) wurden 5 ml/l Spurenelement-Lösung und 0,1 ml/l Antischaumlösung (Desmorphen, Typ 3600Z, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) zugegeben. Der pH-Wert wurde nach dem Autoklavieren im Fermenter auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Tabelle 3.2: Fermentationsmedium nach Evans (1970).

Basismedium (FM):			
	NH <sub>4</sub> Cl	5,35	[g/l]
	KCl	0,75	[g/l]
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1,38	[g/l]
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,28	[g/l]
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,26	[g/l]
	Zitronensäure · H <sub>2</sub> O	0,42	[g/l]
	CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	2,90	[mg/l]
	Hefeextrakt	1,00	[g/l]
	Glycerin	variiert	
	Spurenelement-Lösung (FM)	5,0	[ml/l]
	Desmorphen (Antischaum)	0,1	[ml/l]

Spurenelement-Lösung (FM):			
	FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	5,4	[g/l]
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	2,0	[g/l]
	ZnCl <sub>2</sub>	684	[mg/l]
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	476	[mg/l]
	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	170	[mg/l]
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62	[mg/l]
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	5	[mg/l]
	HCl (konzentriert)	10,0	[ml/l]

### 3.4 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN

#### 3.4.1 Vorkultur

1 ml der aufgetauten Kryokultur (Stammkultur) wurde in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml autoklaviertem Vorkulturmedium pipettiert und über Nacht bei 120 rpm und 37°C inkubiert. Bei aerober oder mikroaerober Fermentation wurde diese Kultur in einen weiteren Erlenmeyerkolben überimpft (1 ml/50 ml) und wie oben inkubiert. Bei anaerober Kultur wurde die erste Vorkultur (1 ml/50 ml) in mit Stickstoff begaste Anaerobenflaschen überführt und für 12 h bei 37°C und 120 rpm anaerob inkubiert. Dabei wurden für die zweite Vorkultur jeweils 5 Parallelansätze inkubiert und vor dem Animpfen des Fermenters steril gemischt, um eine reproduzierbare Zelldichte und Inokulumqualität für Vergleichsfermentationen zu gewährleisten. Die Fermentationen wurden mit einem Verhältnis von 1 Teil Vorkultur zu 9 Teilen Medium inokuliert (10 % Inokulumsregel).

### **3.4.2 Kultivierung im Fermenter**

Alle Fermentationen wurden in einem 4,5 l Setric Bioreaktor (Set 4V, Setric Geniel Industriel, Toulouse, Frankreich) durchgeführt. Dabei wurde ein Arbeitsvolumen von 2,5 l verwendet. Mit Hilfe einer Steuereinheit (MOD 7F, Setric Geniel Industriel, Toulouse, Frankreich) wurde die Temperatur auf 37°C und die Rührerdrehzahl auf 400 rpm eingestellt.

Die Begasungsrate wurde durch Massendurchflussmesser (5850 TR, Brooks Instruments, Beedaal-Holland) und Massendurchflussregler (5876-2, Brooks Instruments) auf einen Wert von 0,4 vvm eingestellt. Die Regelung der Begasung, des Feedings und der Datenaquisition erfolgte durch das Prozessleitsystem (UBICON). Der experimentelle Aufbau ist detailliert in Abbildung 3.2 aufgezeigt.

#### **3.4.2.1 Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration**

Die Messung der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ) erfolgte mittels einer autoklavierbaren Ingold Sauerstoffelektrode (Nr.: 322756702) in Verbindung mit der oben beschriebenen Steuereinheit MOD 7F. Zusätzlich wurde ein faseroptischer 4-Kanalsauerstoffsensor MOPS (**m**ikrocontroller gesteuerter **o**ptischer **p**ortabler **S**auerstoffsensor) zur  $pO_2$ -Messung eingesetzt.

Die Kalibrierung erfolgte mit reinem Stickstoff (0-Wert) und Luft (100 % Luftsättigung).

#### **3.4.2.2 Messung des pH-Werts und des Redoxpotentials**

Für die pH-Wert-Messung und Regelung wurde ein Meredos pH-RP-2SP60 Meß- und Regelgerät (Bovenden, Deutschland) in Verbindung mit einer autoklavierbaren pH-Elektrode der Firma Ingold (Steinbach, Deutschland) verwendet. Der pH-Wert wurde auf pH 7,0 mittels 20 %-iger NaOH eingestellt. Zur Zwei-Punkt-Kalibrierung vor dem Autoklavieren wurden folgende Pufferlösungen verwendet: pH 4,0: Best. Nr. 1.09475.0500; pH 7,0: Best. Nr. 1.09477.0500; Merck, Darmstadt. Nach dem Autoklavieren wurde der pH-Wert offline nochmals verifiziert.

Die Redoxmessung erfolgte mit einer autoklavierbaren Redoxelektrode (Mettler Toledo Pt 4805, Best. Nr. 105053337). Zur Überprüfung der Funktionalität der Elektrode wurde ein Redoxpuffer der Firma WTW, Weilheim verwendet (pH 7,  $U_H = 427$  mV, Best. Nr. 109 740).

### 3.4.3 Prozessführung und Regelstrecken

Die Fed-Batch-Experimente wurden nach dem Prinzip der pH-Wert-gekoppelten Feedreglung bei der Glyceringärung („pH-stat“-Technik), abgewandelt nach Reimann und Biebl (1996) oder nach dem Prinzip der exponentiellen Feedingstrategie nach Korz *et al.* (1995) durchgeführt.

Der Feedfaktor für den substratspezifischen Laugeverbrauch ergibt sich aus

$$F_F = \frac{\dot{Q}_L}{\dot{Q}_S} \quad \text{Gl. 3.1}$$

mit:  $F_F$  = Feedingfaktor

$\dot{Q}_L$  = volumetrische Laugeverbrauchsrate [ $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]

$\dot{Q}_S$  = volumetrische Substratsverbrauchsrate [ $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ ]

Abbildung 3.1 verdeutlicht das Regelungsschema der pH-Wert-gekoppelten Feedreglung.

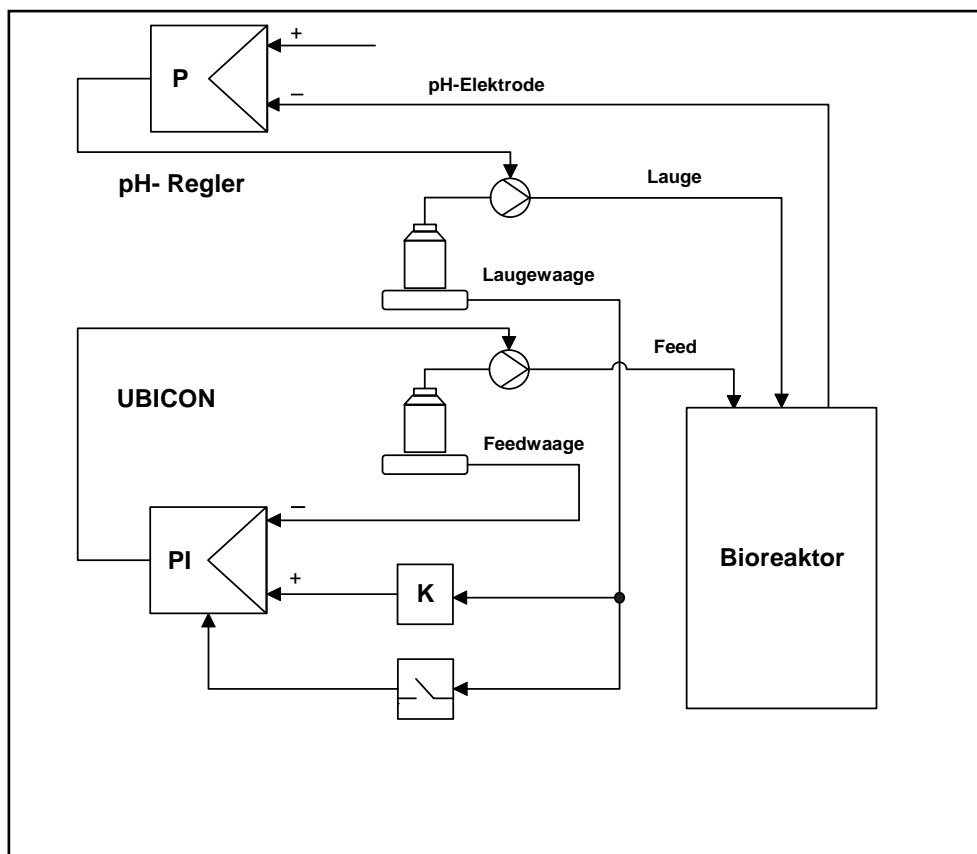


Abbildung 3.1: Regelungsschema der pH-Wert-gekoppelten Feedreglung  
( $K$  = Feedfaktor,  $PI$  = PI-Regler,  $P$  = P-Regler).

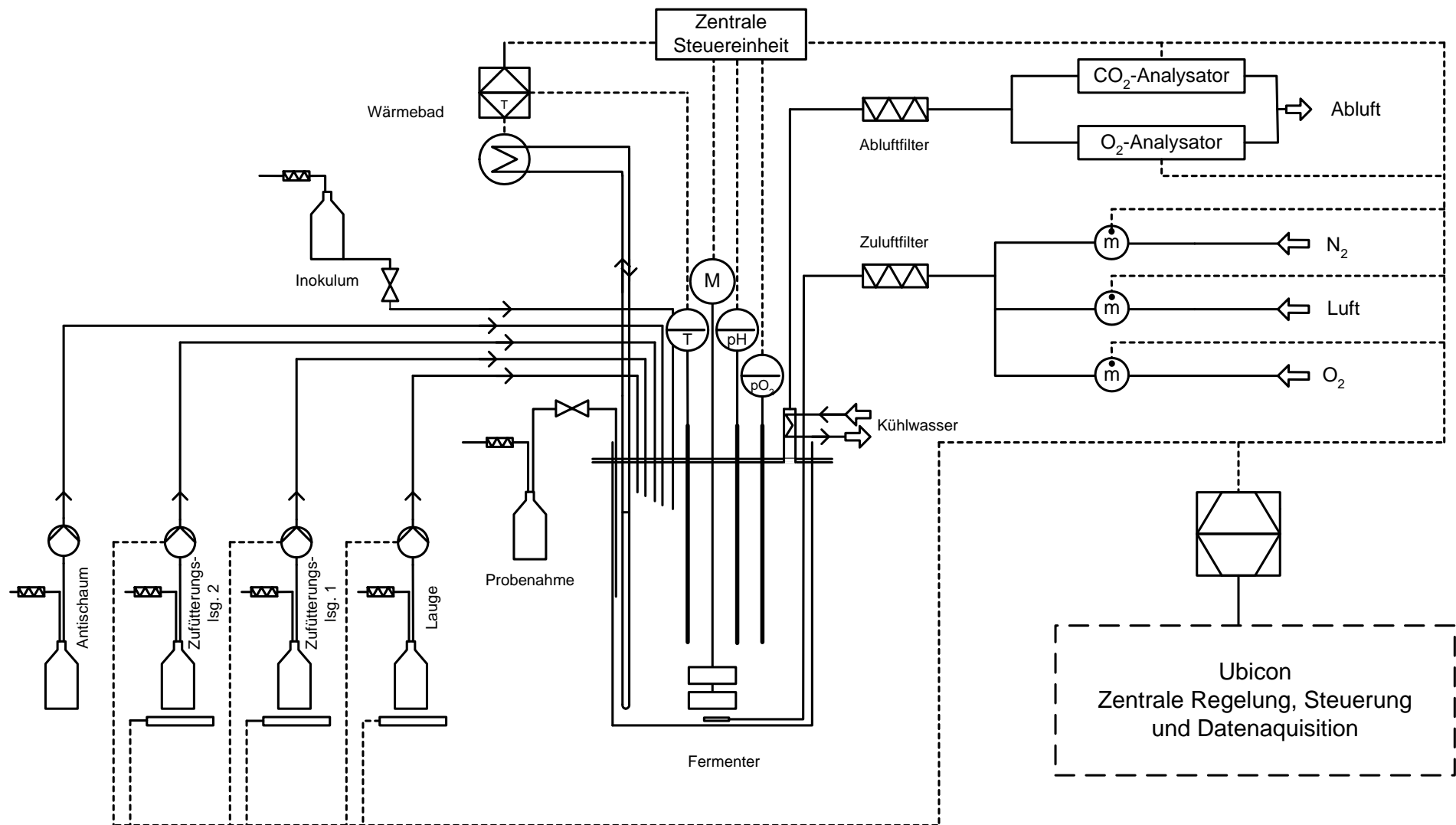


Abbildung 3.2: Fließbild der Fermentationsanlage.



Für die exponentielle Zufütterungsstrategie nach Korz *et al.* (1995) unter Substratlimitierung ergibt sich für den Substratmassenstrom  $\dot{m}_S$ :

$$\dot{m}_S(t) = \left( \frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot V_{t_r} \cdot X_{t_r} \cdot e^{\mu_{set}(t-t_F)} \quad \text{Gl. 3.2}$$

mit:

$\dot{m}_S$	= Substratmassenstrom [g h <sup>-1</sup> ]
$\mu_{set}$	= gewählte / eingestellte Wachstumsrate [h <sup>-1</sup> ]
$V_{t_r}$	= Fermentationsvolumen bei Start der Zufütterung [l]
$X_{t_r}$	= Biomassekonzentration bei Start der Zufütterung [g l <sup>-1</sup> ]
$t_F$	= Zeitpunkt der Zufütterung [h]
$m$	= Erhaltungskoeffizient [g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$Y_{X/S}$	= Biomasseausbeutekoeffizient [g g <sup>-1</sup> ]

Die zeitabhängige Zufütterungsrate ( $\dot{m}'_S(t)$ ) ergibt sich durch das sich ändernde Volumen in Laborfermentern zu:

$$\dot{m}'_S(t) = \dot{m}_S(t) \cdot V(t) / V_{t_r} \quad \text{Gl. 3.3}$$

mit:

$\dot{m}'_S$	= zeitabhängige Zufütterungsrate [g h <sup>-1</sup> ]
$V$	= Fermentationsvolumen [l]

Danach wäre die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  nicht mehr zeitunabhängig, allerdings wirkt sich dies erst im letzten Viertel der Fermentationszeit aus und kann somit vernachlässigt werden (Korz *et al.*, 1995).

Sowohl der Koeffizient  $m$  für die endogene Stoffwechselleistung, als auch der Biomasseausbeutekoeffizient  $Y_{X/S}$  muss empirisch ermittelt werden. Dabei ergab sich  $m$  zu 0,025 g h<sup>-1</sup> und  $Y_{X/S}$  zu 0,39 g g<sup>-1</sup>.

### 3.4.4 Biotransformation

Zur Biotransformation wurden die Zellen am Ende der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet, in 250 ml Polyallomer Zentrifugenflaschen (Herolab, Wiesloch) verbracht und bei 11000 rpm für 30 min in einer Kühlzentrifuge (RC5C, Sorvall Instruments/Kendo, Düsseldorf, Germany) bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Biotransformationspuffer (40g/l Semicarbazidhydrochlorid, 17,4 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6) resuspendiert. Dieser wurde mit dem gleichen Puffer soweit verdünnt, bis die gewünschte Biomasse-

konzentration erreicht war. Anschließend wurde Glycerin zugegeben und jeweils unter verschiedenen Bedingungen in anaeroben Flaschen (100 ml), Erlenmeyerkolben (250 ml) und in einem Bioreaktor bei 30°C inkubiert (Abbildung 3.3).

Die Bioreaktoren (BCC, Göttingen) hatten ein Gesamtvolumen von 1 l und wurden mit einem Arbeitsvolumen von 300 ml verwendet. Die Regelung des pH-Wertes erfolgte durch einen Meredos pH-RP-2SP60-Regler (Bovenden, Deutschland) in Verbindung mit einer autoklavierbaren pH-Elektrode der Firma Ingold (Steinbach, Deutschland).

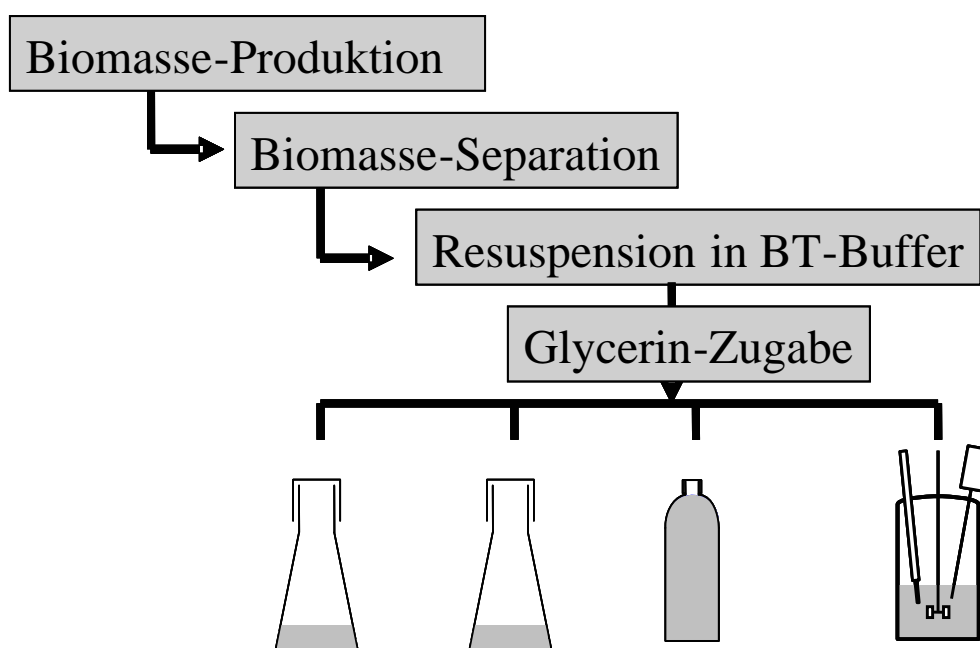


Abbildung 3.3: Vorgehen bei der Biotransformation.

### 3.5 ONLINE-ANALYTIK UND ONLINE-DATENAUFNAHME

#### 3.5.1 Kohlendioxidbestimmung im Abgas

Die Bestimmung des CO<sub>2</sub>-Anteils im Abgas erfolgte mit dem Abgasanalysator UNOR 6N der Firma Maihak (Hamburg, Deutschland). Dieses Gerät arbeitet nach dem Prinzip der nicht-dispersiven Infrarot-Adsorption. Es wurde vor jeder Fermentation neu kalibriert, je nach Anwendung mit N<sub>2</sub> und einer speziellen Gasmischung für CO<sub>2</sub> im Konzentrationsbereich der Mischung (Kalibriergas: 5 % CO<sub>2</sub>, 15 % O<sub>2</sub> und 80 % N<sub>2</sub>).

### **3.5.2 Sauerstoffbestimmung im Abgas**

Der Sauerstoffgehalt im Abgas wurde mit dem Abgasanalysator Oxygor 6B der Firma Maihak (Hamburg, Deutschland) bestimmt. Das Messprinzip beruht auf der charakteristischen Eigenschaft von Sauerstoff: dem Paramagnetismus. Auch dieses Gerät wurde vor jeder Fermentation neu kalibriert, je nach Anwendung mit N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> oder Luft.

### **3.5.3 Datenaquisition**

Sowohl die Datenaufnahme als auch die Prozesskontrolle erfolgte während der Kultivierungen im Reaktor online mit dem UBICON-Kontrollsystem (Universal **B**iotecnological **C**ontrol System, GBF, Braunschweig, ESD, Hannover). Aufgezeichnet wurden alle gemessenen Onlinedaten: O<sub>2</sub>-Konzentration im Fermenter, CO<sub>2</sub>-Konzentration im Abgas, pH-Wert, Begasungsrate, Gewicht der Lauge und das Gewicht des Fermenters.

## **3.6 OFFLINE-ANALYTIK**

### **3.6.1 Bestimmung der optischen Dichte**

Die optische Dichte der Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers vom Typ Novaspec 4049 der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) durch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 650 nm in einer Küvette mit 1 cm Schichtdicke bestimmt. Dazu wurden die Proben so verdünnt, dass ein Messbereich von 0-0,5 gegeben war.

### **3.6.2 Bestimmung der Biotrockenmasse**

Die Biotrockenmasse (BTM) wurde in 15 ml Zentrifugen-Röhrchen des Typs Falcon 2096 der Firma Becton Dickinson Labware (New Jersey, USA) gravimetrisch bestimmt. Diese wurden im Exsikkator getrocknet und gekühlt, danach wurde 10 ml Bakteriensuspension hineingefüllt, bei 7000 rpm für 30 min zentrifugiert, der Überstand entnommen, mit deionisiertem H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut abzentrifugiert (Biofuge 17 S, Heraeus Sepatech). Nach zweimaligem Waschen wurden die Pellets für 48 h im Vakuum-Trockenschrank (Fa. Salvis) bei 60°C und 200 mbar getrocknet. Nach anschließendem Kühlen im Exsikkator und Auswiegen der Gefäße wurde als Differenz zum Leergewicht die Biotrockenmasse erhalten.

Die Biotrockenmasse wurde auch über die optische Dichte ermittelt. Der Umrechnungsfaktor dafür wurde zu

$$BTM (g/l) = 0,489 \cdot OD_{650nm}$$

bestimmt.

### 3.6.3 Bestimmung von Cystein

Die Bestimmung von Cystein erfolgte nach der Methode von Thannhauser (Thannhauser *et al.*, 1984; 1987). Dabei werden alle Thiol- und Disulfidbindungen gemessen. Die Bestimmung beruht auf der Reaktion von 1 mol Disulfidbindungen mit 1 mol Dinatrium-2-Nitro-5-Thiosulfobenzoat (NTSB) zu 1 mol 2-Nitro-5-Thiobenzolsäure (NTB). Die Konzentration an Disulfidbindungen kann dann mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NTB bei 412 nm gemessen werden.

Die Zusammensetzung der NTSB-Assay-Lösung ist in Tabelle 3.3 aufgeführt:

Tabelle 3.3: NTSB-Assay-Lösung nach Thannhauser *et al.* (1987).

Komponente:	Konzentration [mol/l]	g/100 ml
<b>Glycin</b>	0,05	0,375
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b>	0,1	1,26
<b>EDTA</b>	0,003	0,088
<b>NTSB-Stammlösung</b>	1 ml	
Mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 100 ml auffüllen, pH-Wert mit HCl auf pH 9,5 einstellen.		

Die NTSB-Assay-Lösung ist 2 Wochen haltbar.

Das NTSB-Assay setzt sich aus

NTSB-Assay-Lösung	1000 µl
Probe/Standard	50 µl

zusammen, die in ein dunkles Gefäß pipettiert und für 5 min im Dunkeln bei 20°C inkubiert werden. Danach kann die Extinktion bei 412 nm gemessen werden. Die Kalibrierkurve ist für 5-100 mgCystein/l linear.

### 3.6.4 Gaschromatographische Bestimmung

#### 3.6.4.1 Gaschromatographische Bestimmung der Fermentationsprodukte

Die Bestimmung der Fermentationsprodukte Ethanol, Acetat, Acetoin, 2,3-Butandiol und 1,3-Propandiol wurde gaschromatographisch durchgeführt. Tabelle 3.4 zeigt die verwendeten Bedingungen.

*Tabelle 3.4: Bedingungen Gaschromatographie.*

Komponenten	Spezifikation
Autosampler	Chrompack, Type LS 607, Packard, Zürich, Schweiz
Säule	Chromosorb 101, 80-100 mesh, 1 m
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID)
Detektortemperatur	250°C
Injektortemperatur	250°C
Trärgas	N <sub>2</sub>
Temperaturprogramm	1 min bei 150°C, Anstieg (14°C/min) der Temperatur bis 200°C, konstante Temperatur bei 200°C für 8 min

Zur Messung wurden jeweils 1 ml Probe und 100 µl interner Standard verwendet. Zur Kalibrierung wurde folgender Standard (Tabelle 3.5) in den Verdünnungen 1:1, 1:2 und 1:4 benutzt.

*Tabelle 3.5: Standard für die Gaschromatographie.*

Standardlösung	Konzentration [mmol/l]	Interner Standard
<b>Ethanol</b>	88,582	n-Butanol 1,4 % (v/v) in 1 molarer HCL
<b>Acetat</b>	68,220	
<b>Acetoin</b>	2,973	
<b>2,3-Butandiol</b>	6,906	
<b>1,3-Propandiol</b>	160,802	

Von jeder Probe wurde im GC eine Dreifachbestimmung und von verdünnten Proben zusätzlich noch eine Doppelbestimmung vorgenommen, um mögliche Verdünnungsfehler zu erkennen.

Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Apex Chromatography Workstation“ der Firma Autochrom Incorporated (POB 207, Milford, Massachusetts, USA).

### **3.6.4.2 Gaschromatographische Bestimmung von Aceton**

Aceton wurde ebenfalls mit der oben beschriebenen Methode (Kapitel 3.6.4.1) nachgewiesen. Zur Kalibrierung wurde ein Standard von 100 mmol/l mit den Verdünnungen 1:1, 1:2 und 1:4 benutzt.

### **3.6.5 Enzymatische Analysen**

Zur photometrischen Bestimmung von Glycerin und D-Lactat wurden folgende Testkits verwendet: Glycerin (Nr. 3.5.6.1), D-Lactat (Nr. 3.5.6.2), Firma Boehringer Mannheim GmbH (Deutschland). Die Proben wurden zur Inaktivierung möglicher gelöster Enzyme vor der Messung für 5 min bei 80°C inkubiert und bei 13000 rpm (Zentrifuge, Biofuge Fresco, Heraeus) für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und entsprechend verdünnt. Die Messungen wurden jeweils in Doppelbestimmungen mit einem Blindwert und einem Standard ausgeführt.

### **3.6.6 Probenvorbereitung der Biotransformationsproben für die enzymatischen Analysen**

Es wurde festgestellt, dass das bei den Biotransformationsexperimenten verwendete Semicarbazid einen erheblichen Einfluss auf die enzymatischen Analysen aufwies. Durch Zusatz von Propanal kann überschüssiges Semicarbazid unter Wärmeeinfluss zu Semicarbazon abreagieren. Nach Fällung in der Kälte kann dieses Semicarbazon durch Abzentrifugieren der Lösung getrennt werden und somit das Semicarbazid der Lösung entzogen werden und der Einfluss auf die enzymatische Messung eliminiert werden (Abbildung 3.4). Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Die Proben wurden entsprechend verdünnt, im Anschluss erfolgte die Zugabe einer 0,54 molaren Propanallösung im Verhältnis 1:1. Danach wurden die Proben eine Stunde bei 80°C unter Schütteln inkubiert. Die Fällung erfolgte bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Proben 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und, wie in Kapitel 3.6.5 beschrieben, vermessen.

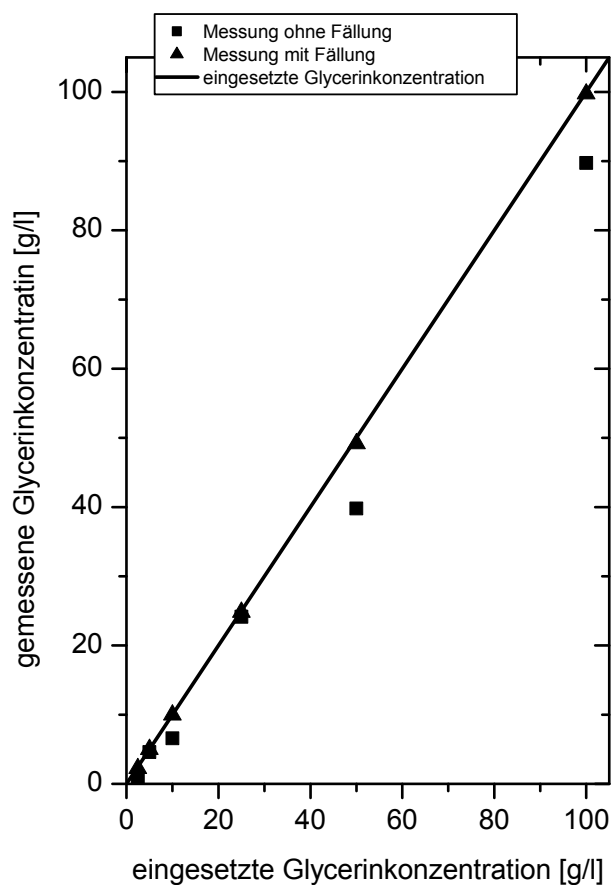


Abbildung 3.4: Einfluss von Semicarbazid (40 g/l) auf die enzymatische Glycerinmessung.

### 3.6.7 3-Hydroxypropionaldehyd-Messung (3-HPA)

Der Assay zur Bestimmung von 3-HPA beruht auf der colorimetrischen Methode von Circle (1945) zur Messung von Acrolein. Dabei werden Tryptophan und Acrolein unter starkem Ansäuern bei 40°C zu einem Farbkomplex umgesetzt, der photometrisch nachgewiesen werden kann. Acrolein und 3-HPA stehen in wässriger Lösung im Gleichgewicht, das vom pH-Wert und der Temperatur abhängig ist (Hall und Stern, 1950). Bei diesem niedrigen pH-Wert kann angenommen werden, dass das gesamte 3-HPA in Form von Acrolein vorliegt. Daher kann zur Kalibrierung Acrolein als Ersatz für 3-HPA verwendet werden, das nicht kommerziell verfügbar ist.

500 µl der entsprechend verdünnten Proben wurden mit 1 ml 37 %-ige HCl und 250 µl Tryptophan-Reagenz (10 mmol/l *DL*-Tryptophan in 0,05 M HCl mit 2,5 ml Toluol als Lösungsvermittler) versetzt und bei 40°C inkubiert, um eine stabile Farbreaktion zu erhalten. Nach

20 min wurden die Proben sofort im Eisbad auf 4°C verbracht und nach Abkühlen bei 560 nm vermessen. Zur Aufnahme der Standardkurve, wie auch zur Messung der Proben, wurden Triplets verwendet. Die Standardkurve ist für 1-125 mg Acrolein/l linear.

### 3.6.8 Bestimmung von Semicarbazid durch HPLC

Die Konzentrationen von Semicarbazid wurden mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Verwendet wurde dazu eine Anlage der Firma Kontron Instruments (Autosampler Modell 360 und das Pumpensystem Modell 322), ein UV-Detektor (Modell 332, Kontron) und ein Refraktionsindex (RI)-Detektor des Typs ERC-7512 (Erma, Tokio). Die Messungen erfolgten dabei unter folgenden Bedingungen:

HPLC-Säule	Aminex HPX-87H, 300*7,8 mm (Bio-Rad, USA)
Vorsäule	Micro-Guard (Bio-Rad, USA)
Laufmittel	5mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Flussrate	0,6 ml/min
Säulentemperatur	60°C
RI-Detektortemperatur	35°C
Wellenlänge UV-Detektor	210 nm
Injektionsvolumen	20 µl
Laufzeit	30 min

Es wurde eine Stammlösung von 359 mmol/l angesetzt. Zur Kalibrierung wurden davon die Verdünnungen 1:10, 1:20 und 1:50 eingesetzt.

## 3.7 BERECHNUNGEN:

### 3.7.1 Bestimmung der Wachstumsrate

Zur Ermittlung der Wachstumsraten wurden die ermittelten Biotrockenmassekonzentrationen in einem halblogarithmischen Maßstab gegenüber der Zeit aufgetragen. Die Wachstumsrate ergibt sich aus der ermittelten Steigung der Geraden durch die Wertepunkte nach folgender Gleichung:

$$\mu = \frac{\ln \frac{x_2}{x_1}}{(t_2 - t_1)} \quad \text{Gl. 3.4}$$

Zur Ermittlung der maximalen Wachstumsrate wurde eine Gerade durch jeweils 3 Wertepunkte gelegt und die maximale Steigung ermittelt (Abbildung 3.5).



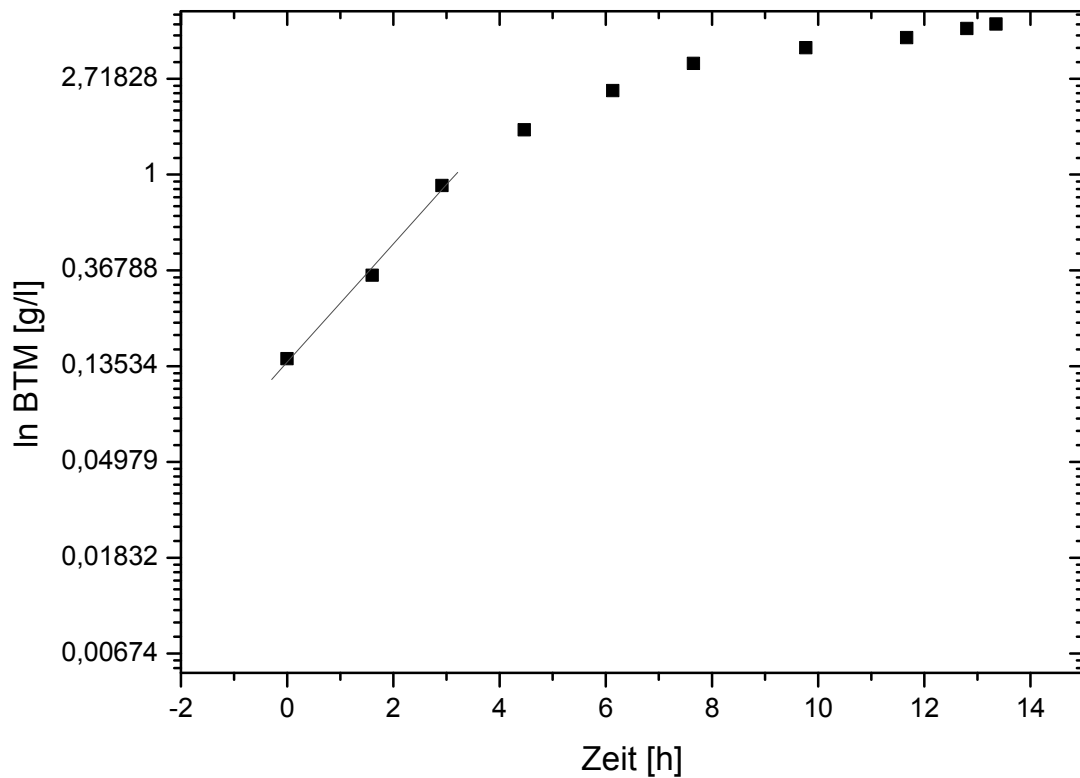


Abbildung 3.5: Bestimmung der maximalen Wachstumsrate.

### 3.7.2 Berechnung von OTR, CTR, RQ

Unter Annahme gleicher Inertgasanteile der Zu- bzw. Abluft im Reaktor bei der Sauerstoffbe-  
gasung kann die Sauerstofftransferrate (OTR) bzw. der Karbondioxidtransferrate (CTR) onli-  
ne berechnet werden, zu:

$$OTR = \frac{M_{O_2} \cdot \dot{V}_G^{ein}}{V_R \cdot V_M} \left[ x_{O_2}^{ein} - x_{O_2}^{aus} \cdot \frac{1 - x_{O_2}^{ein} - x_{CO_2}^{ein}}{1 - x_{O_2}^{aus} - x_{CO_2}^{aus}} \right] \quad \text{Gl. 3.5}$$

$$CTR = \frac{M_{CO_2} \cdot \dot{V}_G^{ein}}{V_R \cdot V_M} \left[ x_{CO_2}^{aus} \cdot \frac{1 - x_{O_2}^{ein} - x_{CO_2}^{ein}}{1 - x_{O_2}^{aus} - x_{CO_2}^{aus}} - x_{CO_2}^{ein} \right] \quad \text{Gl. 3.6}$$

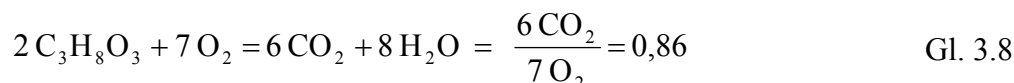
Der Respirationskoeffizient ergibt sich aus:

$$RQ = \frac{CTR \cdot M_{O_2}}{OTR \cdot M_{CO_2}} \quad \text{Gl. 3.7}$$

mit:

OTR	= Sauerstofftransferrate	[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
CTR	= Karbondioxidtransferrate	[g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$\dot{V}_G^{\text{ein}}$	= Begasungsrate	[l h <sup>-1</sup> ]
$x_{\text{O}_2}^{\text{ein}}$	= O <sub>2</sub> -Anteil Zuluft	[mol/mol]
$x_{\text{CO}_2}^{\text{ein}}$	= CO <sub>2</sub> -Anteil Zuluft	[mol/mol]
$x_{\text{O}_2}^{\text{aus}}$	= O <sub>2</sub> -Anteil Abluft	[mol/mol]
$x_{\text{CO}_2}^{\text{aus}}$	= CO <sub>2</sub> -Anteil Abluft	[mol/mol]
$V_R$	= Arbeitsvolumen	[l]
$V_M$	= molares Gasvolumen	[=22,4 L/mol]
$M_{\text{O}_2}$	= molare Masse von O <sub>2</sub>	[=32 g/mol]
$M_{\text{CO}_2}$	= molare Masse von CO <sub>2</sub>	[=44 g/mol]

Wird als Kohlenstoffquelle Glycerin eingesetzt, so hat der RQ unter aeroben Bedingungen bei vollständiger Veratmung zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O den Wert 0,86 (Gleichung 3.8). Ein Wert größer als 0,86 zeigt die Bildung von Gärungsprodukten wie Ethanol oder Acetat an.



### 3.7.3 Berechnungen der Produktbildungsrate und Ausbeute

Die Berechnung der Produktbildungsrate  $\dot{Q}_P$  ergibt sich aus:

$$\dot{Q}_P = \frac{\Delta c_P}{\Delta t} \quad \text{Gl. 3.9}$$

Die substratbezogene Ausbeute eines Produktes  $Y_{P/S}$  bzw. die Biomasseausbeute  $Y_{X/S}$  ergibt sich zu:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta c_P}{\Delta c_S} \quad \text{Gl. 3.10}$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta c_X}{\Delta c_S} \quad \text{Gl. 3.11}$$

Umfassende Berechnung der Kohlenstoff- und Wasserstoffbilanzen wurde bereits an anderer Stelle veröffentlicht (Zeng *et al.*, 1993; Hartlep, 2006)

---

## 4 *ERGEBNISSE UND DISKUSSION*

---

### 4.1 PRODUKTION AKTIVER BIOMASSE IN BATCH-KULTUR

Zur biotechnologischen Produktion von 3-Hydroxypropionaldehyd eignet sich das Verfahren von Slininger und Bothast (Kapitel 2.3.2.3) am besten, da es höhere Endkonzentrationen und Ausbeuten ermöglicht, als andere biotechnologische Verfahren (Tabelle 2.8). Es wurde daher als Basis für diese Arbeit herangezogen.

In den Arbeiten von Slininger und Bothast wurden aerobe Bedingungen zur Produktion von aktiver Zellmasse beschrieben, die dann abzentrifugiert, in Semicarbazidpuffer aufgenommen und zur Herstellung von 3-HPA benutzt wurde (Kapitel 2.3.2.3). Es ist jedoch bekannt, dass das für die Biotransformation bzw. für die 3-HPA Produktion entscheidende Enzym, die Glycerindehydratase (GDHt), nicht unter strikt aeroben Bedingungen exprimiert wird (Kapitel 2.3.2.2.2), da das Gen der GDHt Teil des *dha*-Regulons ist (Abbildung 2.11), das nicht unter strikt aeroben Bedingungen exprimiert wird (Ruch und Lin, 1975; Forage und Lin, 1982).

Um den Einfluss der Sauerstoffkonzentration für die Produktion von aktiver Biomasse für die Biotransformation zu untersuchen, wurden Batch-Fermentationen unter aeroben, sauerstofflimitierenden und anaeroben Bedingungen untersucht.

Die darauf folgenden Biotransformationsexperimente wurden ebenfalls unter anaeroben und sauerstofflimitierenden Bedingungen durchgeführt, um die Effizienz der unter den verschiedenen Bedingungen produzierten aktiven Biomasse für die Konversion von Glycerin in 3-HPA zu untersuchen.

#### 4.1.1 Strikt aerobe Biomasseproduktion

In diesem Versuch soll geklärt werden, ob – wie behauptet - sowohl die Herstellung von 1,3-Propandiol als auch die Herstellung von aktiver Zellmasse zur Produktion von 3-HPA unter strikt aeroben Bedingungen möglich ist. Die Bedingungen der Fermentation wurden in Kapitel 3.4.2 beschrieben, abweichend war die Rührgeschwindigkeit von 1000 rpm. Die Gelöstsauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ) sollte einen Wert von 30 % Luftsättigung nicht unterschreiten. Dies wurde durch die Zugabe von molekularem Sauerstoff erreicht. 100 g/l Glycerin wurden als Substrat im Fermentationsmedium vorgelegt. Die beschriebenen Bedingungen

konnten nur für die ersten 6 Stunden der Fermentation aufrechterhalten werden (Abbildung 4.1). Danach fällt der  $pO_2$ -Wert unter die 30 %-Marke. Die Kultivierung wurde kurz danach

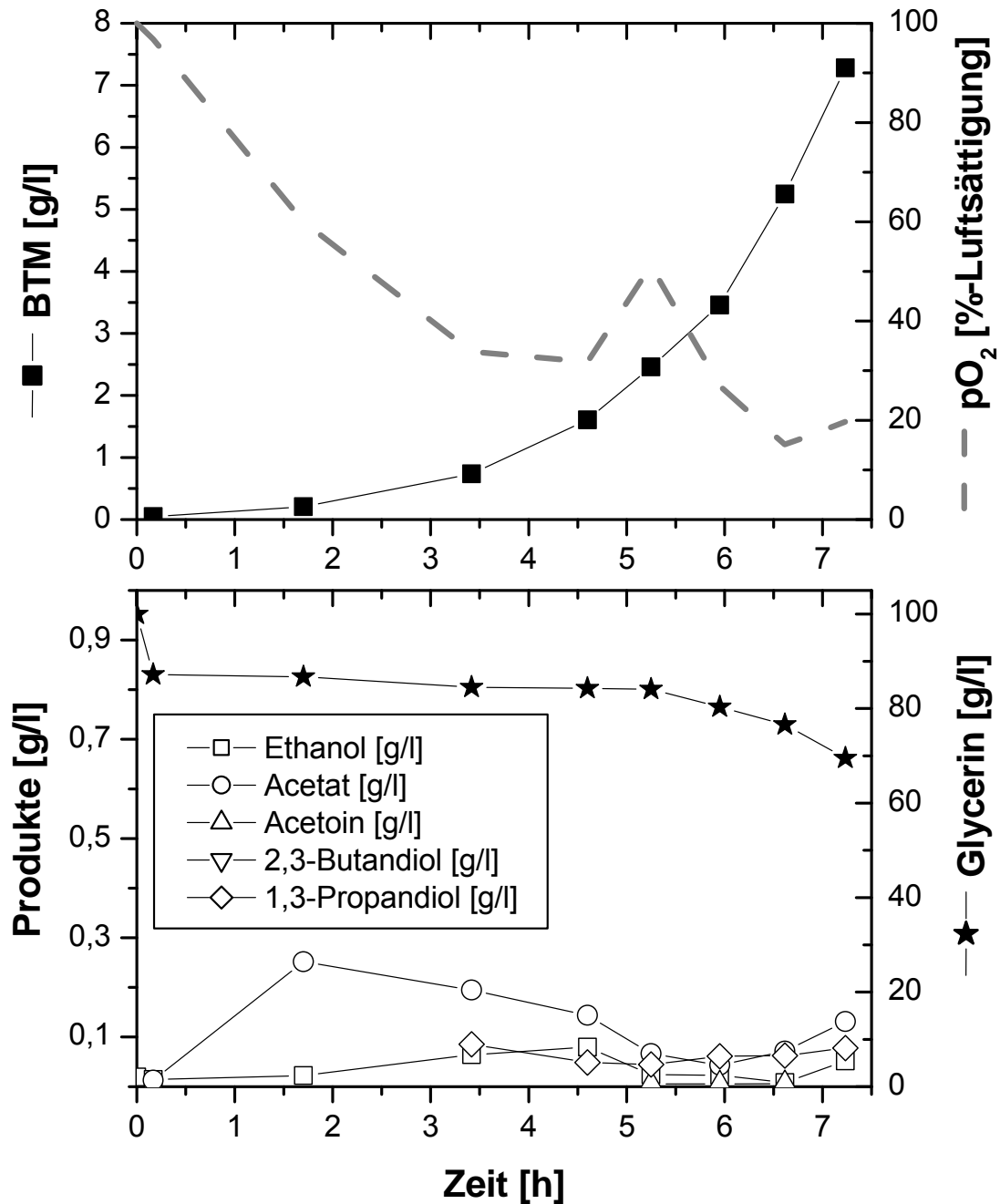


Abbildung 4.1: Fermentationsverlauf unter aeroben Bedingungen.

beendet. Eine Biomasse-Endkonzentration (BTM) von 7,3 g/l mit einer maximalen Wachstumsrate von  $0,84 \text{ h}^{-1}$  wurde erzielt, 30,5 g Glycerin wurden dabei verbraucht. Diese maximale Wachstumsrate ist signifikant höher als die für das Wachstum auf Glycerin und bei glei-

chem pH-Wert beschriebene theoretische maximale Wachstumsrate unter anaeroben Bedingungen von  $0,71 \text{ h}^{-1}$  für *K. pneumoniae* (Zeng *et al.*, 1994 a). Die Biomasse wurde sofort nach Beendigung der Fermentation abgeerntet und für die 3-HPA Produktion in den Biotransformationsexperimenten (6,75 g/l bzw. 3,25 g/l), sowohl unter sauerstofflimitierenden Bedingungen in Schüttelkolben (Abbildung 4.2), als auch unter anaeroben Bedingungen in anaeroben Flaschen eingesetzt.

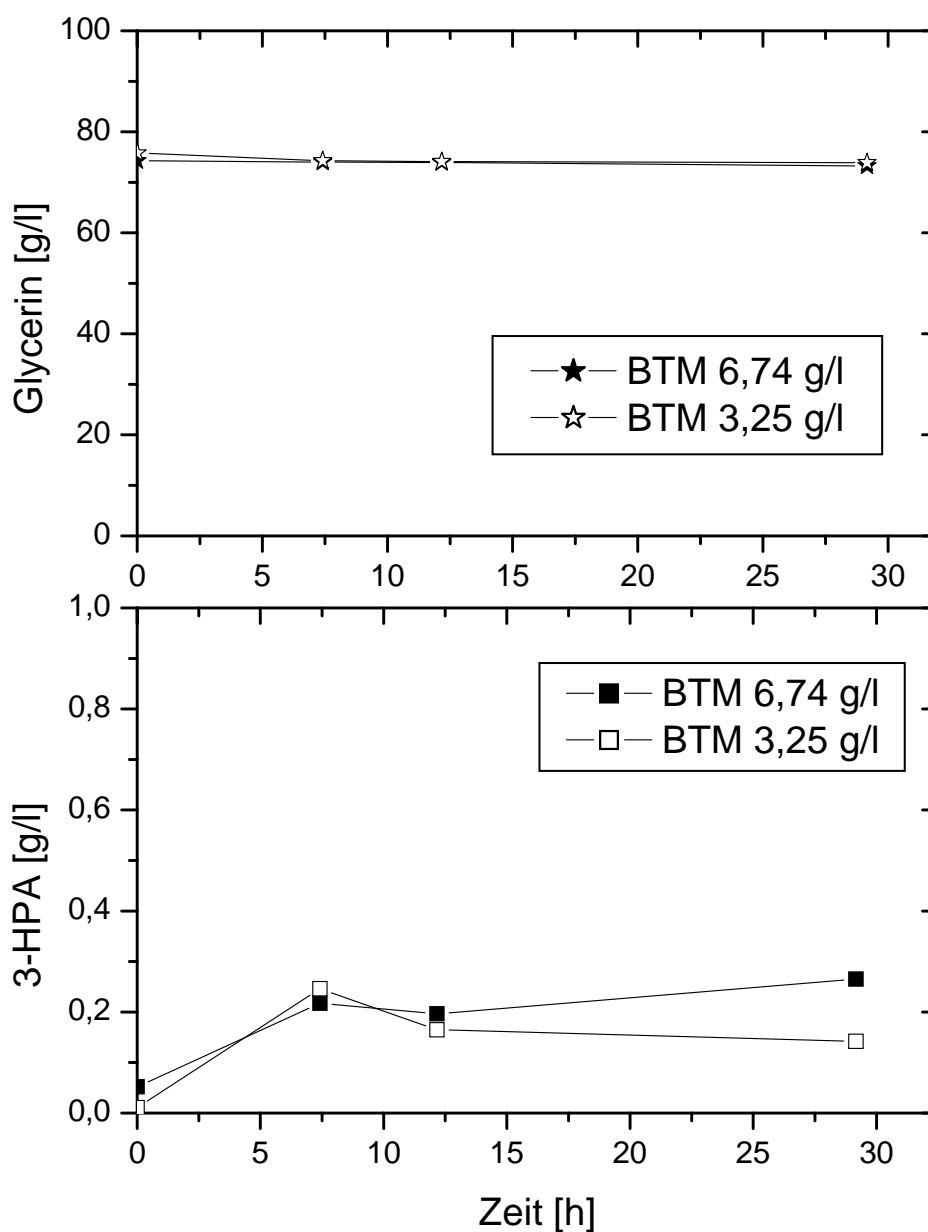


Abbildung 4.2: Verlauf der Biotransformation in Schüttelkolben mit Biomasse aus aerobere Kultur.

Es zeigt sich, dass vernachlässigbar geringe Mengen an 3-HPA gebildet wurden: Maximal 0,2 g 3-HPA konnte unter sauerstofflimitierten Bedingungen erreicht werden (Abbildung 4.2), während unter anaeroben Bedingungen kein 3-HPA produziert wurde. Dies verdeutlicht, dass unter strikt aeroben Bedingungen keine aktive Biomasse für den Biotransformationsprozess erzeugt werden kann. Das *dha*-Regulon wird nur zu einem ganz geringen Teil induziert, somit kann auch die für die 3-HPA Produktion essentielle GDHt nicht exprimiert werden.

#### **4.1.2 Zellproduktion unter sauerstofflimitierten Bedingungen**

In diesem Versuch wurden zur Biomasseproduktion sauerstofflimitierende Bedingungen mit einer Glycerinausgangskonzentration von 125 g/l gewählt. Die Begasungsrate wurde auf 0,4 vvm eingestellt, begast wurde mit einem Volumenstrom bestehend aus 50 % Luft und 50 % Stickstoff. Zusätzlich wurden diskontinuierlich 200 g Hefeextraktlösung mit einer Konzentration von 50 g/kg Hefeextrakt zugefüttert, um eine möglichst große Zellmasse für die Biotransformation zu erreichen.

Nach 3 h wurde die Sauerstofflimitation erreicht und das *dha*-Regulon induziert, was eine steigende 1,3-Propandiolproduktion aufzeigt (Abbildung 4.3). Nach 13 h wurde eine Biomassekonzentration von 4,8 gBTM/l bei einer maximalen Wachstumsrate von  $0,62 \text{ h}^{-1}$  erreicht. Dabei wurden 123 g Glycerin in 13,4 h verbraucht und eine 1,3-Propandiol-Konzentration von 39 g/l erreicht. Dies entspricht einer Ausbeute von 38 % (mol/mol) mit einer 1,3-Propandiolbildungsrate von 2,92 g/l h. Als hauptsächliches Nebenprodukt entstand Acetat. Die erhaltene 1,3-Propandiolbildungsrate entspricht der von Chen *et al.* (2003) erhaltenen, allerdings wurde hier eine größere Ausbeute von 56 % (mol/mol) erzielt. Jedoch wurden bei dieser mikroaerophilen Batch-Fermentation eine geringere Glycerinanfangskonzentration von 40 g/l verwendet und somit auch eine geringere Endkonzentration von 17,7 g PD/l erhalten. Für die Biotransformation wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert, in Semicarbazidpuffer (pH 6) aufgenommen. Danach erst wurde Glycerin (60 g/l) zugegeben.

Die erhaltene Biomasse wurde sowohl unter sauerstofflimitierenden Bedingungen wie auch unter anaeroben Bedingungen untersucht.

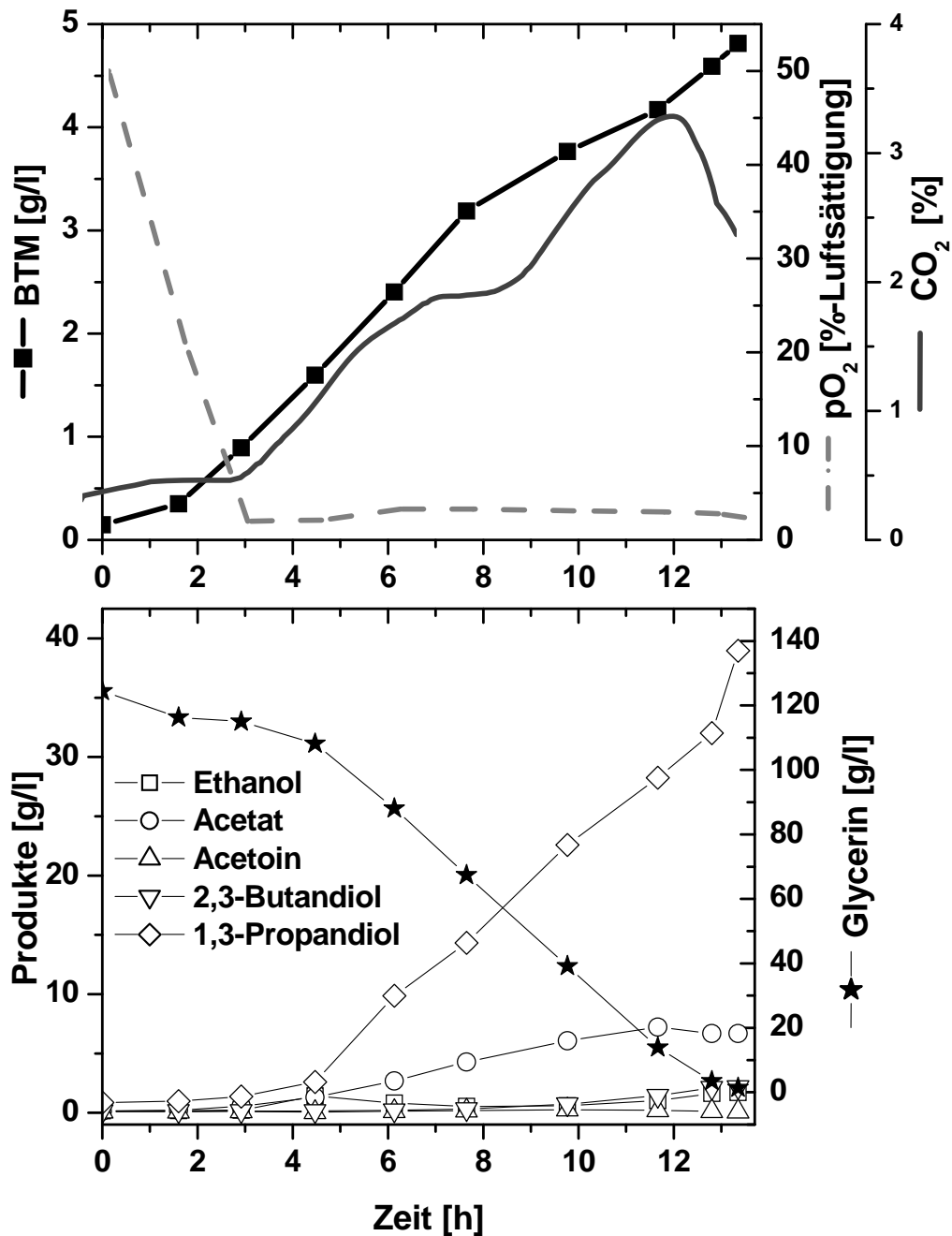


Abbildung 4.3: Verlauf der Batch-Fermentation zur Biomasseproduktion unter sauerstofflimitierenden Bedingungen.

Die Biotransformation unter sauerstofflimitierenden Bedingungen (s. Abbildung 4.4) wurde im Bioreaktor (s. Kapitel 3.4.4) durchgeführt, dabei wurde der pH-Wert auf pH 6, die Temperatur auf 30°C, und der Sauerstoffpartialdruck auf 5 % Sauerstoffsättigung eingestellt. Die Biotransformation unter anaeroben Bedingungen wurde in anaeroben Flaschen (Abbildung 4.5) untersucht.

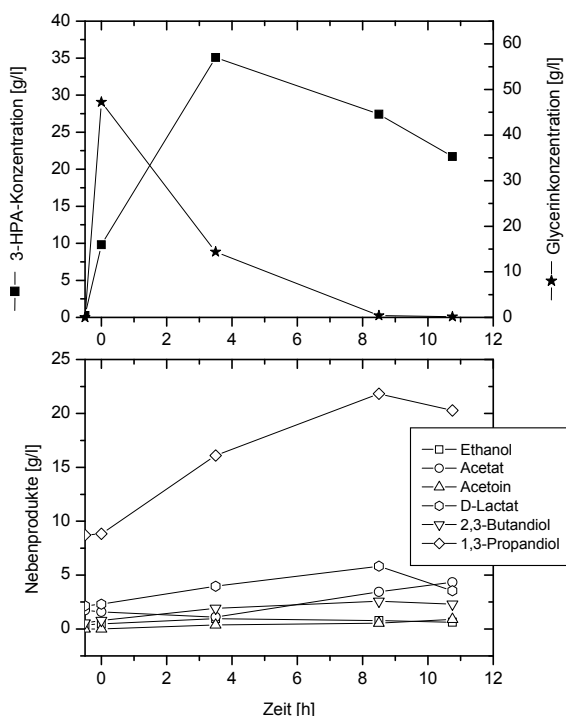


Abbildung 4.4: Verlauf der Biotransformation im Bioreaktor mit Biomasse aus sauerstofflimitierter Kultur.

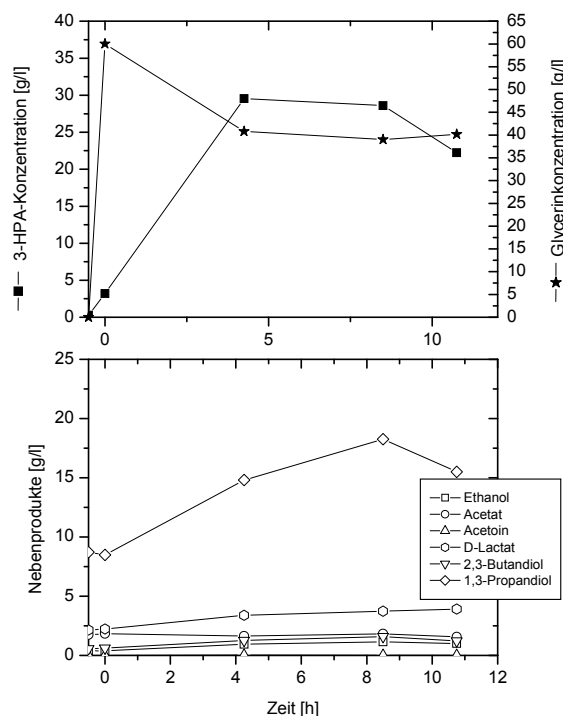


Abbildung 4.5: Verlauf der Biotransformation in anaeroben Flaschen mit Biomasse aus sauerstofflimitierter Kultur.

Eine maximale 3-HPA-Konzentration von 35 g/l innerhalb von 3,5 h konnte unter sauerstofflimitierten Bedingungen im Bioreaktor mit der eingesetzten Biomassekonzentration von 10 g/l erreicht werden. Daraus resultierend wurde eine Ausbeute von 72 % (mol/mol) und eine volumetrische Produktivität von 10 g/l h erreicht. Mit derselben Biomassekonzentration wurde unter anaeroben Bedingungen der Biotransformation eine maximale 3-HPA-Konzentration von 29,5 g/l mit einer etwas geringeren Ausbeute von 62 % (mol/mol) und einer geringeren Produktivität von 7 g/l h erreicht. Dies zeigt auf, dass für die Biotransformation sauerstofflimitierende Bedingungen günstiger sind als anaerobe.

Auffällig am Verlauf der 3-HPA Bildung unter allen Bedingungen ist die so genannte Peak-Bildung, d.h. die Konzentration von 3-HPA steigt in den ersten Stunden, um dann wieder abzufallen. Dies konnte von der Gruppe um Bothast nicht geklärt werden. Aus den oben gezeigten Verläufen der Biotransformationsexperimente kann dies jedoch – zumindest teilweise – auf Bildung von Propandiol zurückgeführt werden. Ein Teil des 3-HPA wird noch weiter zu 1,3-Propandiol umgesetzt. Weitere Nebenprodukte sind vor allem D-Lactat und Acetat.



### **4.1.3 Biomasseproduktion unter anaeroben Bedingungen**

Die Glycerinkonversion zu 1,3-Propandiol wird normalerweise unter anaeroben Bedingungen ausgeführt. Deshalb sollte hier auch untersucht werden, ob anaerobe Bedingungen ebenfalls für die Produktion aktiver Zellmasse für den Einsatz in der Biotransformation geeignet sind, und wie diese Ergebnisse mit denen von aus sauerstofflimitiert produzierter Biomasse zu vergleichen sind. Dazu wurde als Glycerinausgangskonzentration 110 g/l eingesetzt. Begast wurde mit reinem Stickstoff mit einer Begasungsrate von 0,4 vvm. Zusätzlich wurden kontinuierlich 200 g einer Hefeextraktlösung mit einer Konzentration von 50 g/kg Hefeextrakt zugefüttert, um eine möglichst große Zelldichte zu erreichen.

Abbildung 4.6 zeigt den Verlauf der Fermentation unter anaeroben Bedingungen. Es wurde eine maximale Biomassekonzentration von 4,0 gBTM/l innerhalb von 14,9 h bei einer maximalen Wachstumsrate von  $0,47 \text{ h}^{-1}$  erreicht. Dabei wurden 103 g Glycerin verbraucht und eine 1,3-Propandiol-Konzentration von 41 g/l erreicht. Dies entspricht einer Ausbeute von 47 % (mol/mol) bei einer 1,3-Propandiolbildungsrate von 2,7 g/l h.

Für die Biotransformation wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert, in Semicarbazidpuffer (pH 6) aufgenommen und Glycerin (65 g/l) zugegeben. Die Biomasse aus dieser Kultivierung wurde ebenfalls in der Biotransformation mit einer Konzentration von 10 g/l unter sauerstofflimitierten wie anaeroben Bedingungen getestet.

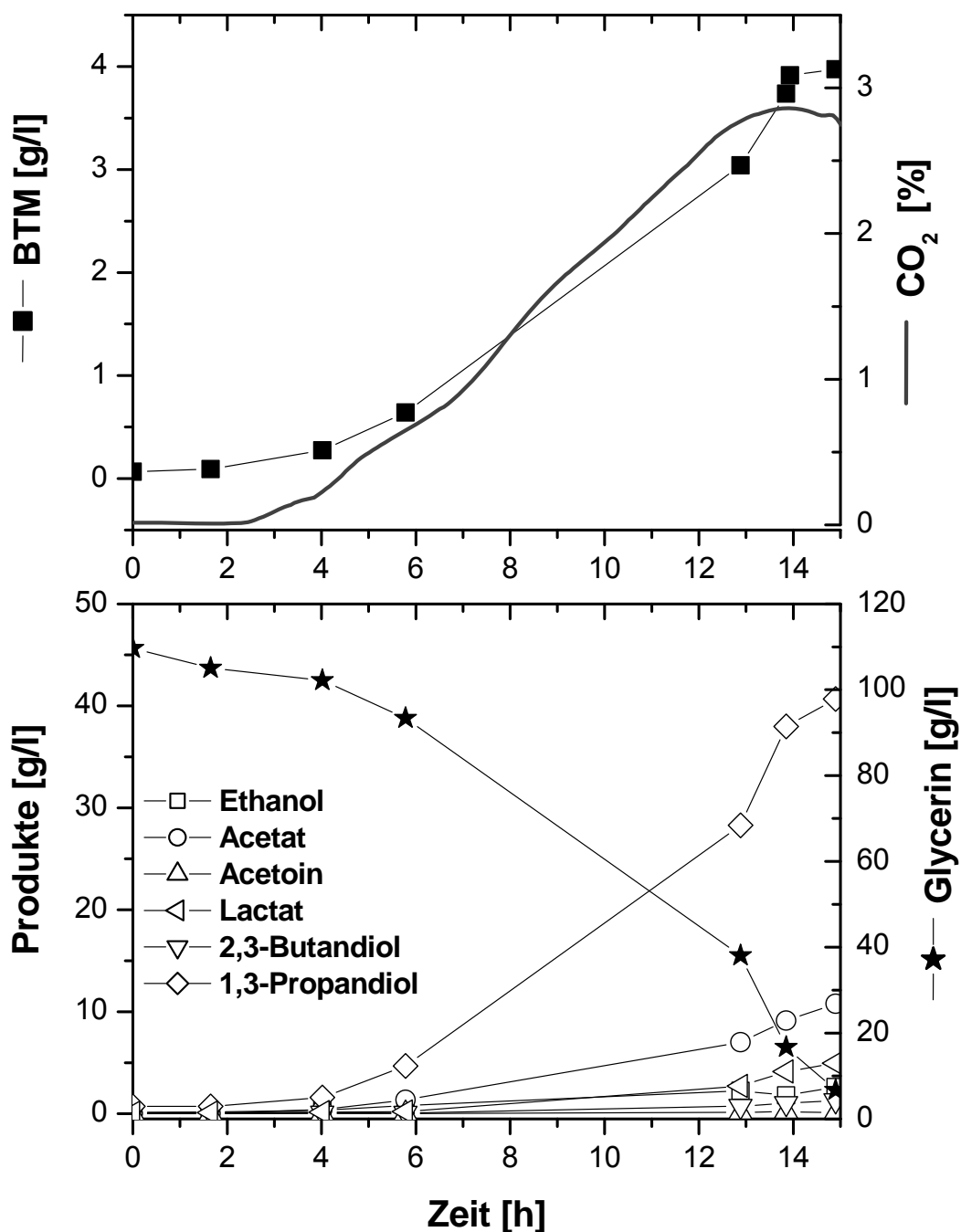


Abbildung 4.6: Verlauf der Batch-Fermentation zur Biomasseproduktion unter anaeroben Bedingungen.

Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen wurde eine maximale 3-HPA-Konzentration von 27 g/l innerhalb von 3,8 h und einer Ausbeute von 76 % (mol/mol) mit einer volumetrischen Produktivität von 7,1 g/l h erhalten. Unter anaeroben Bedingungen wurde eine maximale 3-HPA-Konzentration von 22,1 g/l mit einer etwas geringeren Ausbeute von 70 % (mol/mol)

und einer geringeren Produktivität von 5,4 g/l h erhalten. Dies deutet darauf hin, dass für die Biotransformation sauerstofflimitierte Bedingungen anaeroben Bedingungen gegenüber zu bevorzugen sind.

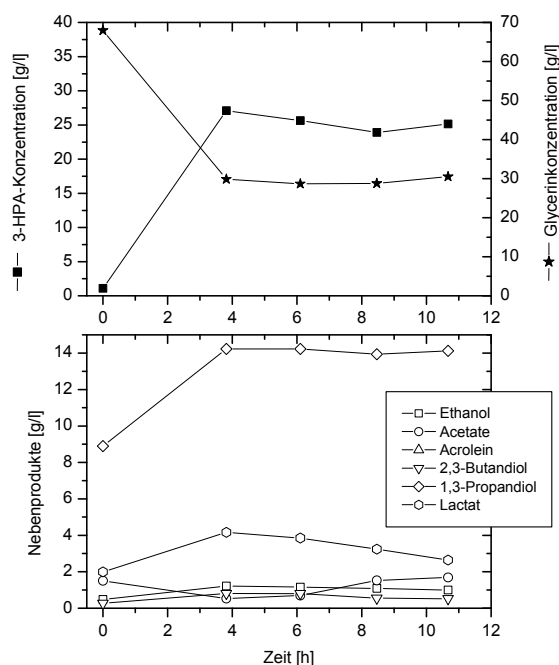


Abbildung 4.7: Verlauf der Biotransformation unter sauerstofflimitierten Bedingungen mit Biomasse aus anaerober Kultur.

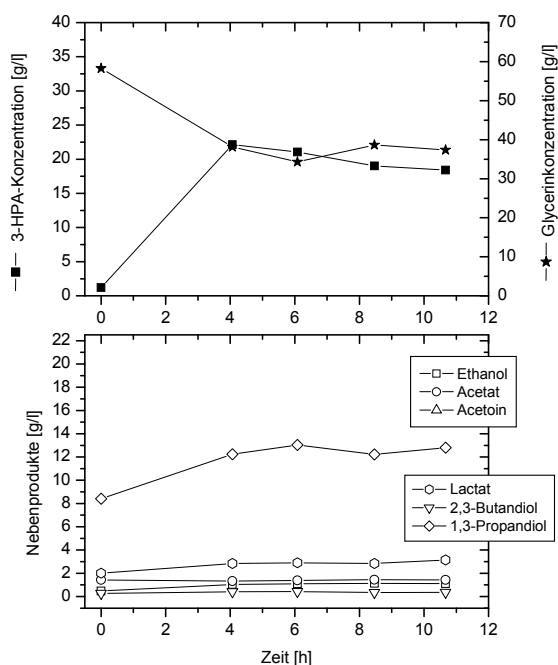


Abbildung 4.8: Verlauf der Biotransformation in anaeroben Flaschen mit Biomasse aus anaerober Kultur.

Die Verläufe der Biotransformationsexperimente gleichen den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen. Auch hier wird nach ca. 4 h eine Peak-Konzentration an 3-HPA erreicht, das dann im weiteren Verlauf teilweise zu 1,3-Propandiol umgesetzt wird. Die hohen Anfangskonzentrationen von vor allem 1,3-Propandiol lassen sich nur bedingt dadurch erklären, dass während der Zentrifugation bzw. während der Experimentvorbereitung Restglycerin zu 1,3-Propandiol umgesetzt wird.

#### 4.1.4 Zusammenfassung

Tabelle 4.1 zeigt die Zusammenfassung der Biotransformationsexperimente in Abhängigkeit von den Redoxbedingungen bei der Biomasseproduktion und im Reaktionsansatz. In der Literatur wird öfter von aerober 1,3-Propandiolproduktion gesprochen (z.B. Vancauwenberge *et al.*, 1990 und Hill und Tran-Dinh, 1989). Wie aus den vorangegangenen Versuchen jedoch hervorgeht, können dies keine strikt aeroben Bedingungen sein, da das *dha*-Regulon dann nicht induziert wird (Kapitel 2.3.2.2.1). Es wird also weder 1,3-Propandiol, noch aktive Zellmasse für die 3-HPA Produktion gebildet. Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen (Abbildung 4.3) jedoch wird sowohl 1,3-Propandiol gebildet, als auch sehr aktive Zellmasse gebildet (Tabelle 4.1). Unter sauerstofflimitierten Bedingungen ist das Zellwachstum als auch die 1,3-Propandiolbildung schneller als unter anaeroben Bedingungen (Tabelle 4.2). Allerdings ist die Ausbeute an 1,3-Propandiol bezogen auf das Substrat Glycerin geringer.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Biotransformationsexperimente.

Bedingungen der Biomasseproduktion	Bedingungen der Biotransformation	C <sub>3-HPA</sub> [g/l]	Q <sub>3-HPA</sub> [g/l h]	Y <sub>HPA/Gly</sub> [mol/mol]
<b>Sauerstofflimitiert</b>	Sauerstofflimitiert	35,1	10,0	0,72
	Anaerob	29,5	6,9	0,62
<b>Anaerob</b>	Sauerstofflimitiert	27,1	7,1	0,76
	Anaerob	22,1	5,4	0,70

Tabelle 4.2: Vergleich der Redoxbedingungen für die Produktion aktiver Biomasse.

Bedingungen der Biomasseproduktion	μ <sub>max</sub> [1/h]	C <sub>Pd</sub> [g/l]	Q <sub>Pd</sub> [g/l h]	Y <sub>Pd/Gly</sub> [mol/mol]
<b>Aerob (O<sub>2</sub>-Konz. &gt; 30 %)</b>	0,84	-	-	-
<b>Sauerstofflimitiert</b>	0,62	29,5	2,9	0,38
<b>Anaerob</b>	0,48	27,1	2,7	0,47

Sowohl für die Biomasseproduktion als auch für die Biotransformation erwiesen sich sauerstofflimitierende Bedingungen für beide Produktionsprozesse als optimal. In dieser Kombination wurde eine Konzentration von 3-HPA mit 35,1 g/l mit einer Bildungsrate von 10 g/l h und einer Ausbeute von 72 % (mol/mol) erreicht.

Um zu erklären, warum sauerstofflimitierende Bedingungen optimal für beide Produktionsprozesse sind, soll an dieser Stelle noch einmal auf die Wirkungsweise der GDHt eingegangen werden. Sie ist in Kapitel 2.4.1 ausführlich erklärt.

Die Glycerindehydratase (GDHt), die die Konversion von Glycerin zu 3-HPA katalysiert, ist, wie erwähnt, Vitamin B<sub>12</sub>-abhängig. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass sauerstofflimitierende Bedingungen für die Vitamin B<sub>12</sub>-Produktion bei *Rhodopseudomonas gelatinosa* optimal sind (Noparatnaraporn *et al.*, 1986). Dies kann auch für *K. pneumoniae* angenommen werden. Weiterhin wird die GDHt durch ihr Substrat Glycerin während der Katalyse durch einen auf ihrer eigenen Wirkungsweise beruhenden Mechanismus inaktiviert (s. Kapitel 2.4.1). Ein Reaktivierungsfaktor vermittelt den ATP-abhängigen Austausch von enzymgebundenen, Adenin-fehlendem zu freiem Adenin-haltigem Cobalamin (Poznsanskaya *et al.*, 1977; Mori *et al.*, 1997 a, b; Tobimatsu *et al.*, 1999; Kajiura *et al.*, 2001).

Dieser Reaktivierungsprozess wird von einem bioenergetischen Standpunkt aus gesehen besser ablaufen, da die ATP-Regeneration unter sauerstofflimitierenden gegenüber anaeroben Bedingungen verbessert ist.

## **4.2 OPTIMIERUNG DER PRODUKTION AKTIVER BIOMASSE IM FED-BATCH-VERFAHREN**

In Kapitel 4.1 konnte gezeigt werden, dass sauerstofflimitierende Bedingungen für die Produktion aktiver Biomasse für die Biotransformation vorteilhaft sind.

Zwei Punkte sind vor allem ausschlaggebend: Die Konzentration an Biomasse, die für die Biotransformation eingesetzt werden kann und ihre Aktivität. Hohe Biomassekonzentrationen können vor allem mit Fed-Batch-Verfahren erzeugt werden. Deshalb sollen hier die Aufzuchtbedingungen unter sauerstofflimitierten Bedingungen im Fed-Batch-Verfahren genauer untersucht werden.

### **4.2.1 Produktion aktiver Biomasse mit Glycerin**

Alle hier gezeigten Fed-Batch-Fermentationen wurden mit einer Anfangskonzentration von 50 g/l Glycerin begonnen. Als Feedlösung wurde eine wässrige Lösung bestehend aus 85 % Glycerin und 0,5 % Hefeextrakt verwendet. Zur Einstellung des pH-Werts wurde eine 20 %-ige NaOH-Lösung verwendet. Die Feedlösung wurde mit der pH-Wert-gekoppelten Feedregelung (Kapitel 3.4.3) zugefüttert. Der Feedfaktor lag zwischen 1,7 und 1,9 und wurde je nach Bedarf eingestellt.

Zuerst wurde untersucht, ob sauerstofflimitierende Bedingungen mit einem konstanten Luftvolumenstrom, wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, für die Produktion von aktiver Biomasse mit Hilfe von Fed-Batch-Verfahren förderlich sind. Hier wurde ein Volumenstrom mit einer Mischung von 33 % Luft und 67 % Stickstoff mit einer Belüftungsrate von 0,4 vvm gewählt.

In Abbildung 4.9 ist diese Fermentation dargestellt. Es fällt auf, dass eine lange lag-Phase kurz nach Ende der Batch-Phase (Fermentationsstunde 6) bzw. am Anfang des Zufütterns mit Feedlösung ab Fermentationsstunde 9-26 auftritt. Die Sauerstoffaufnahme (OTR) fällt ab, der  $pO_2$ -Wert steigt, es wird weniger Sauerstoff verbraucht. Dies kann durch eine Änderung des Metabolismus (metabolic switching) erklärt werden, wie er bei Wang *et al.* (2003) beschrieben wurde. Es wird zuviel 3-HPA produziert (nicht gemessen, vergleiche aber Abbildung 4.10), das nicht in 1,3-Propandiol umgesetzt wird: 3-HPA wird ausgeschleust, akkumuliert sich und wirkt toxisch auf den wachsenden Organismus (Barbirato *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2006). Ist die Aktivität der GDHt hoch, wird mehr 3-HPA gebildet und es kommt zu einer längeren lag-Phase.

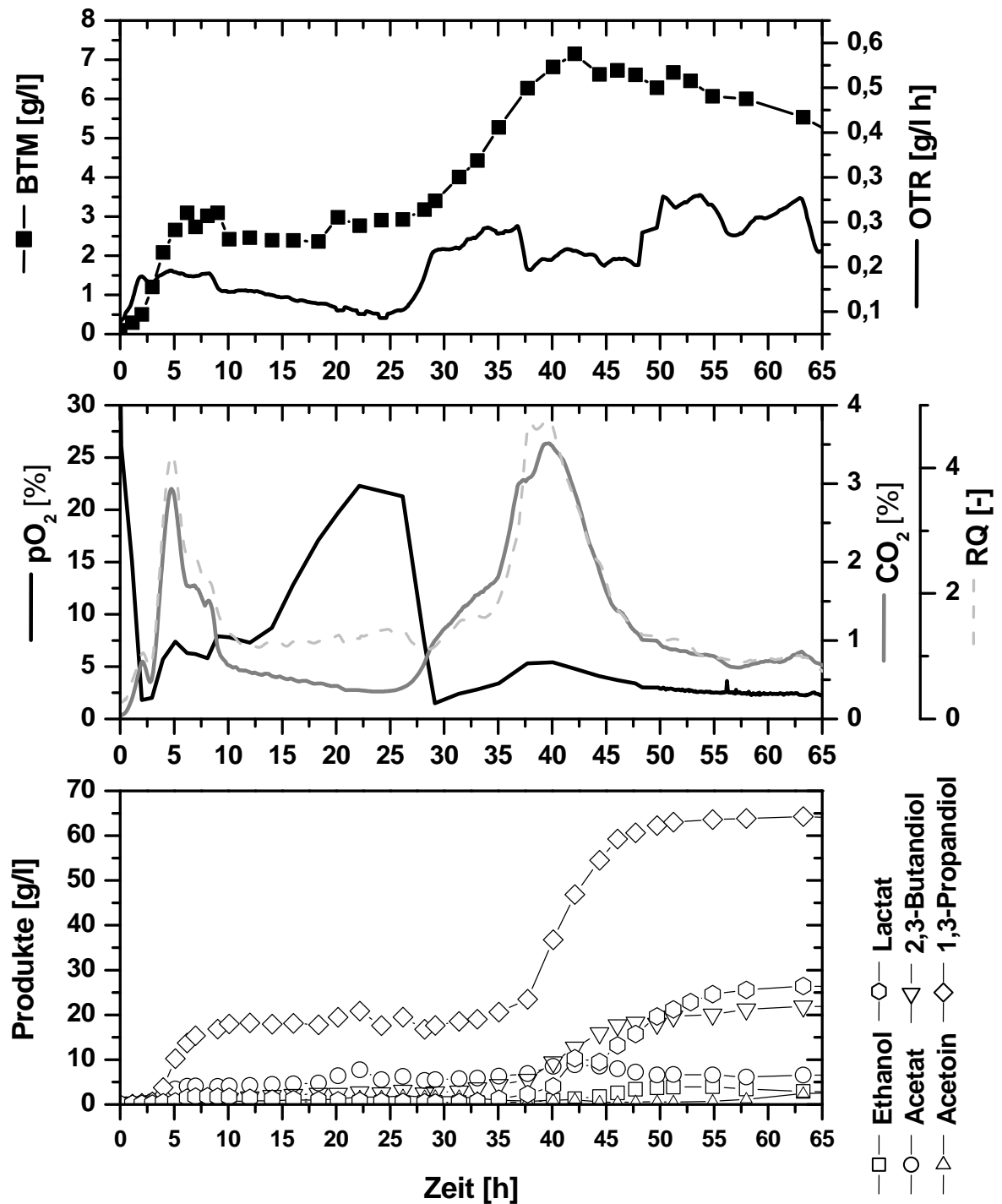


Abbildung 4.9: Sauerstofflimitierte Fed-Batch-Fermentation mit einem konstanten Volumenstrom mit 33 % Luft und 66 % Stickstoff.

Nach der Akkumulation von 3-HPA lassen sich in anaerober Kultur Stress-induzierte Proteine nachweisen, die eine Störung von Stoffwechsel und Wachstum aufzeigen (Wang *et al.*, 2003).

Mehrere Faktoren können bei der Akkumulation von 3-HPA eine Rolle spielen: Eine sehr hohe Aktivität der GDHt, die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten, die Reduzierung der Aktivität der PDOR und das Umschalten der Reduktionsaktivität der PDOR auf ein oder mehrere bisher unbekannte Oxidoreduktasen (HOR) (Wang *et al.*, 2003). Unter mikroaerophilen Bedingungen konnten Zheng *et al.* (2008) nachweisen, dass die Akkumulation von 3-HPA mit *Klebsiella pneumoniae* AC 15 mit der Glycerin-Anfangskonzentration zusammenhängt, die einen Wert von 40 g/l nicht überschreiten sollte (0,5 vvm; 250 rpm).

Insgesamt wurde nach 63 h eine Endkonzentration von 64 g/l Propandiol erreicht, jedoch mit einer relativ geringen Ausbeute von 32 % (mol/mol) und einer moderaten volumetrischen Produktivität von 1,02 g/l h; bedingt durch die lange lag-Phase, die die Bildung aktiver Zellmasse verzögerte und zu geringeren Raumausbeuten führte. Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen wird mehr Zellmasse gebildet als unter anaeroben (Kapitel 4.1), auch erreicht man mit einem Fed-Batch-Prozess mehr Zellmasse (7 gBTM/l) verglichen mit der Batch-Fermentation (4,8 gBTM/l; Kapitel 4.1.2). Diese Zellmasse ist nach Überwindung der lag-Phase auch bezüglich der Induktion des *dha*-Regulons und somit auch für die 1,3-Propandiolproduktion aktiv. Betrachtet man nur die exponentielle Phase nach der lag-Phase, ergibt sich eine volumetrische Produktivität von 4,6 g/l h und zeigt damit, dass die Zellmasse für die 1,3-Propandiolbildung und somit auch für die Biotransformation sehr aktiv ist. Es gibt mehrere Publikationen, in denen mikroaerophile Bedingungen für die Produktion von 1,3-Propandiol mit *K. pneumoniae* in Batch-Kultur oder Fed-Batch-Kultur beschrieben werden (Huang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003 a, b; Cheng *et al.*, 2004, 2005; Hao *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2008). Leider können diese Versuche nur schlecht miteinander verglichen werden, da weder OTR noch RQ oder zumindest der  $pO_2$ -Verlauf angegeben wurden. Die Sauerstoffverfügbarkeit bzw. die Produktionsbedingungen unter mikroaerophilen Bedingungen hängen jedoch stark von der Reaktorgeometrie (Byun *et al.*, 1994) als auch vom Begasungssystem und Rührgeschwindigkeit ab. Tendenziell wurden eine geringere Rührgeschwindigkeit (< 300 rpm) und geringere Glycerin-Anfangskonzentrationen verwendet (< 40 g/l) als in den hier beschriebenen Versuchen.

Chen *et al.* (2003) berechneten einen für die mikroaerophile 1,3-Propandiol-Produktion optimalen Bereich des Respirationskoeffizienten von 2,66-11,54 vor. Allerdings wurde dieser Bereich nicht experimentell optimiert. Bei dieser Fermentation bleibt der Wert des Respirationskoeffizienten immer über einem Wert von 1 und zeigt somit an, dass nicht alles Glycerin veratmet wird, was bei einem Wert von 0,86 der Fall wäre (Kapitel 3.7.2). In den Phasen mit



starker 1,3-Propandiolbildung (Fermentationsstunde 3-6 und 38-46) bewegt sich der RQ zwischen einem Wert von 2-4,7 und zeigt somit einen optimalen Bereich an.

Um eine lange lag-Phase zu vermeiden, wird im nächsten Versuch (Abbildung 4.10) untersucht werden, ob durch die Regelung der  $pO_2$ -Konzentration im Reaktor eine Verringerung

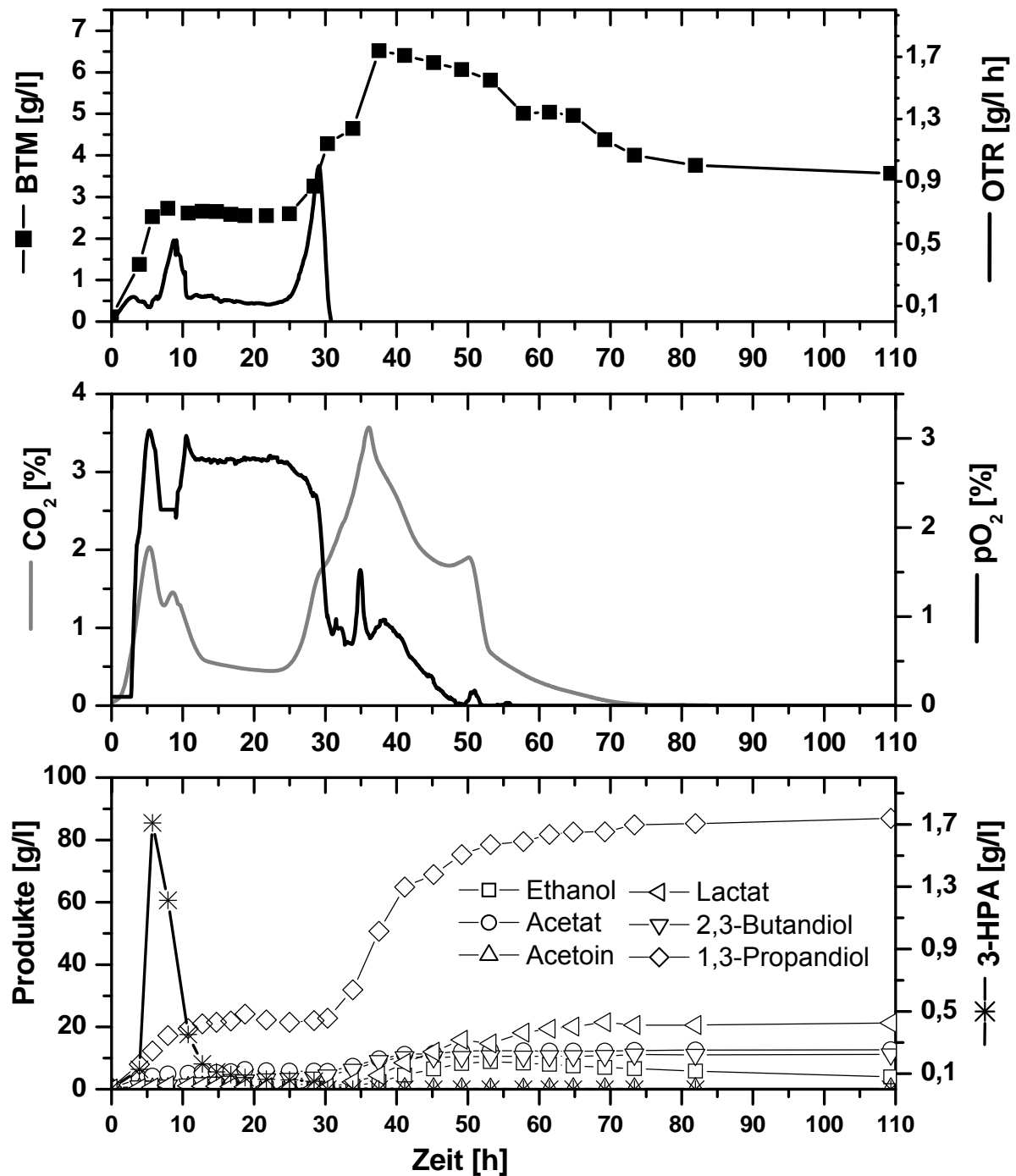


Abbildung 4.10: Mikroaerobe/anaerobe Fed-Batch-Fermentation.

der 3-HPA-Akkumulation erreicht und trotzdem aktive Zellmasse produziert werden kann. Um die 1,3-Propandiolproduktion zu maximieren, sollte in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase die Sauerstoffzufuhr langsam herabgeregelt werden. Durch die  $pO_2$ -Regelung konnte die lag-Phase etwas verkürzt werden, jedoch nicht wesentlich. 3-HPA wird gebildet, ausgeschleust und hemmt den wachsenden Organismus, so dass eine lag-Phase auftritt. Aus Abbildung 4.10 wird deutlich, dass die 3-HPA-Bildung in der ersten exponentiellen Wachstumsphase (Batch-Phase) erfolgt und dadurch die lag-Phase eingeleitet wird. Die lag-Phase bleibt so lange bestehen (Fermentationsstunde 25) bis das 3-HPA völlig abgebaut ist und ein neues exponentielles Wachstum beginnen kann.

Auffällig ist die hohe 1,3-Propandiol-Endkonzentration. Durch den Wechsel von aerob auf anaerobe Bedingungen können 85 g/l 1,3-Propandiol produziert werden. Dies entspricht einer der höchsten Konzentrationen an 1,3-PD, die mit *K. pneumoniae* erreicht wurden (Hartlep, 2006). Insgesamt wurde eine volumetrische Produktivität von 1,04 g/l h erreicht, mit einer Ausbeute von 41 % (mol/mol). Betrachtet man nur die 2. exponentielle Wachstumsphase, wird eine volumetrische Produktivität von 3,89 g/l h erreicht.

Da die lag-Phase ausschließlich mit Hilfe der  $pO_2$ -Reglung nicht entscheidend vermindert werden konnte, sollte im anschließenden Versuch die lag-Phase durch eine zusätzliche, exponentielle Zufütterung von Hefeextraktlösung vermieden werden. Es ist bekannt, dass sich durch den verstärkten Einsatz von Hefeextrakt positive Effekte auf das Wachstum des Organismus im Allgemeinen, als auch auf die 1,3-Propandiolbildung erzielen lassen (Hartlep, 2006; Held, 1996).

Durch die exponentielle Zufütterung von Hefeextrakt konnte tatsächlich die Ausbildung einer lag-Phase vermieden werden und es kam zu keinem Bruch zwischen exponentieller Wachstumsphase von Batch- und Fed-Batch-Phase (Abbildung 4.11). Die volumetrische Produktivität über den gesamten Prozess erhöhte sich auf 2,16 g/l h mit einer finalen 1,3-Propandiol-Konzentration von 84 g/l nach 39 h mit einer etwas geringeren Ausbeute von 38 % (mol/mol). Interessant erscheint der Verlauf des  $pO_2$ -Werts. Ab Fermentationsstunde 2 konnte der  $pO_2$ -Wert nicht mehr auf 3 % gestellt werden, da ein scheinbarer  $pO_2$ -Wert angezeigt wird, der über 3 % liegt. Deshalb wurde eine statische Belüftung manuell mit einem Volumenstrom von 0,4 vvm mit einem Mischungsverhältnis von 7 % Luft und 93 % Stickstoff manuell eingestellt und bis zur Fermentationsstunde 11 gehalten und danach mit reinem Stickstoff begast. Trotz fehlender Sauerstoffzufuhr wurde ein maximaler scheinbarer  $pO_2$ -Wert von 35 % Luftsättigung gemessen. Der  $pO_2$ -Wert nähert sich in seinem Verlauf der  $CO_2$ -Kurve. In Abbildung

4.10 wird dieses Phänomen auch schon deutlich, wenn auch in einem geringeren Umfang. Ab Fermentationsstunde 32 steigt der  $pO_2$ -Wert nochmals an und nähert sich im Verlauf der  $CO_2$ -Kurve, obwohl kein Sauerstoff mehr zugeführt wird.

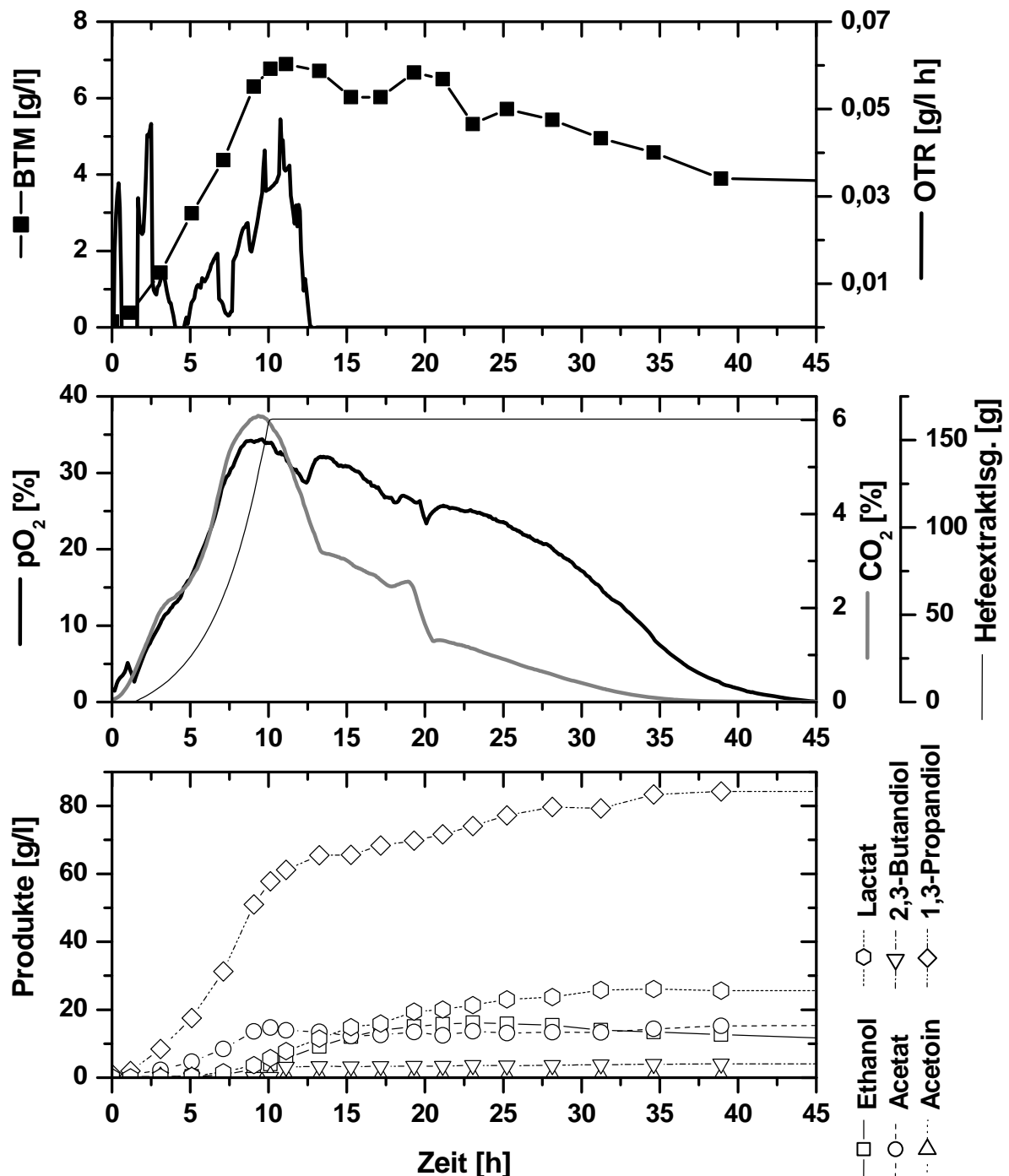


Abbildung 4.11: Mikroaerobe/anaerobe Fed-Batch-Fermentation unter exponentieller Zufütterung von Hefeextraktlösung zum Anfang des Fermentationsprozesses.

Es kann wie folgt zusammengefasst werden:

Durch eine geeignet gewählte Zufütterungsstrategie (Fed-Batch-Prozess) können höhere Konzentrationen an aktiver Biomasse für die Biotransformation erhalten werden. Ohne Zufütterung von Hefeextrakt wird durch die intermediäre Bildung von 3-HPA *K. pneumoniae* im Wachstum gehemmt und der Fed-Batch-Prozess durch eine lange lag-Phase ausgebremst.

Wird jedoch Hefeextrakt verstärkt zugefüttert, lässt sich diese Hemmung vermeiden und es können ähnlich hohe Konzentrationen an 1,3-Propandiol erzielt werden. Allerdings lässt sich eine  $pO_2$ -Regelung mit Clark-Elektroden nicht mehr aufrecht erhalten, da überhöhte Messwerte erhalten werden, die mit dem zugefütterten Hefeextrakt und der  $CO_2$ -Konzentration zusammenhängen. Dieses Phänomen wird im Anhang näher beschrieben werden. Regelungen von  $pO_2$  oder Redoxpotential (Zheng *et al.*, 2008) erscheinen für mikroaerophile Fermentationen nicht sehr zweckmäßig. Erfolgversprechender kann eine experimentelle Bestimmung des optimalen Bereichs des RQ-Wertes (Zeng und Deckwer, 1992; Zeng *et al.*, 1994 b) zur mikroaerophilen 1,3-Propandiolproduktion sein, und diesen zur Regelung einzusetzen.

### 4.2.2 Optimierung der Biotransformation

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob sowohl die Ausbeute als auch die 3-HPA Endkonzentration im Biotransformationsschritt erhöht werden kann.

Die Biomasse für die Biotransformation wurde aus einer Fed-Batch-Kultur unter sauerstofflimitierenden Bedingungen erhalten (Abbildung 4.12).

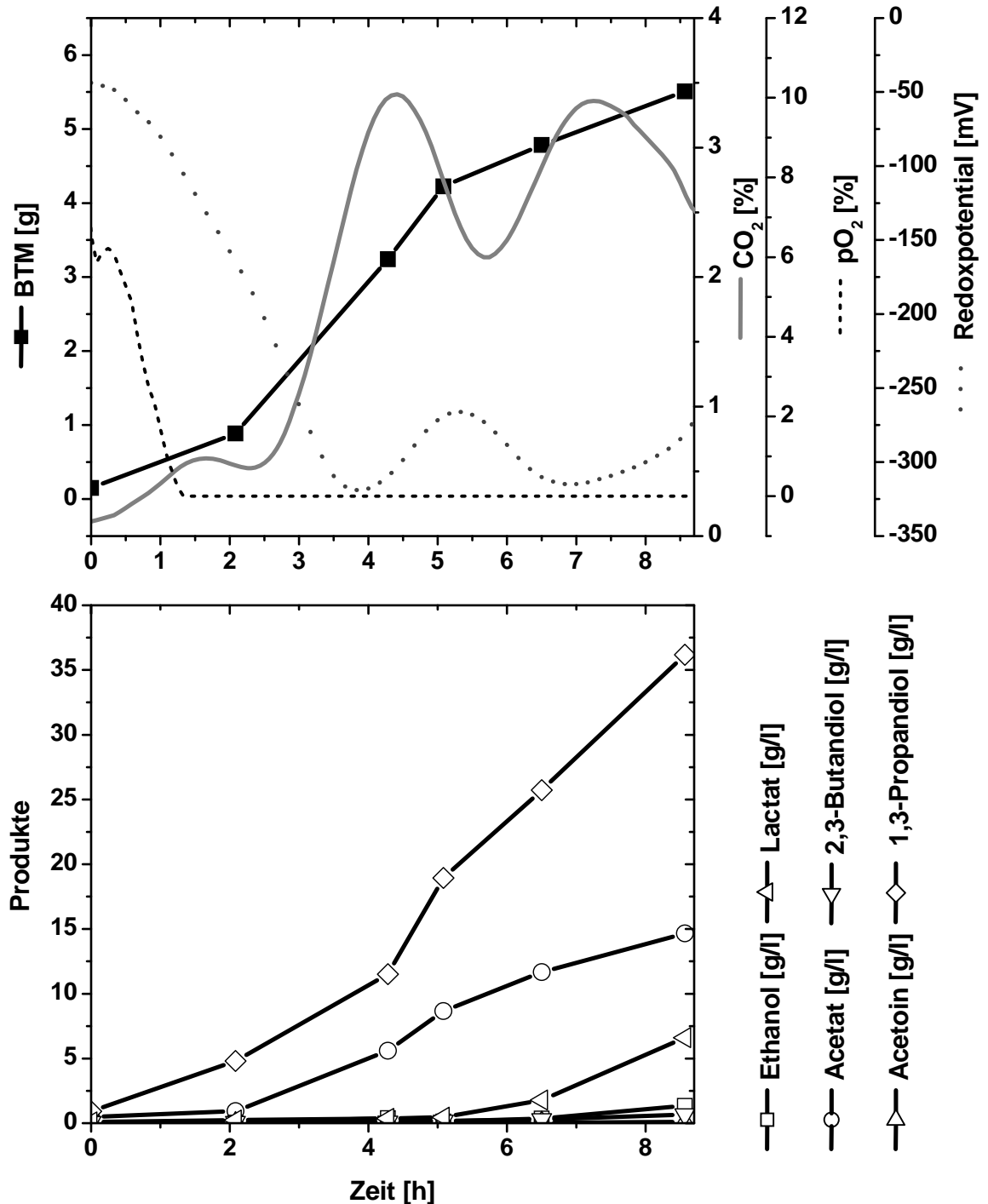


Abbildung 4.12: Glycerinfermentation zur Erzeugung aktiver Biomasse unter sauerstofflimitierenden Bedingungen.

Um schnell sauerstofflimitierende Bedingungen zu erhalten, wurde eine Begasung mit einer Gasmischung von 80 % Stickstoff und 20 % Luft angewendet. Zusätzlich zur Glycerinzufütterung wurde in den ersten 4 Stunden eine 25 %-ige Hefeextraktlösung zugefüttert, um die Biomasseproduktion zu beschleunigen und die 3-HPA Bildung zu verhindern. Nach 8 h wurde die aktive Biomasse aus der exponentiellen Wachstumsphase abgeerntet und für die Biotransformationsexperimente benutzt.

Zuerst wurde untersucht, ob eine lineare Erhöhung der Semicarbazidkonzentration zu einer Verbesserung in der 3-HPA Ausbeute führen kann. Eine zusätzliche Erhöhung der Biomassekonzentration sollte aufzeigen, ob damit eine weitere Erhöhung der 3-HPA Endkonzentration bei hoher Semicarbazidkonzentration möglich ist.

In den ersten 4 h (Phase 1, Abbildung 4.13) des Biotransformationsprozesses wurde bei einer Biomassekonzentration von 10 g/l die Semicarbazidkonzentration kontinuierlich durch Zufütterung einer 44,4 %-igen Semicarbazidlösung von 40 g/l auf 92 g/l erhöht. Es wurde eine sehr hohe Ausbeute von 98 % (mol/mol) erreicht, mit einer moderaten Konzentration von 20 g/l 3-HPA und einer Produktivität von 4 g/l h. Die Bildung von Nebenprodukten war entsprechend stark reduziert.

Die verringerte volumetrische Produktivität kann darauf zurückgeführt werden, dass eine starke Inhibition oder Toxizität des Semicarbazids sich bei solch hohen Konzentrationen stärker bemerkbar macht. In der zweiten Phase des Experiments wurde die Semicarbazidkonzentration konstant bei 92 g/l gehalten und neue aktive Biomasse und Substrat zugegeben, um eine Biomasseendkonzentration von 14 g/l und eine Glycerinkonzentration von 67 g/l zu erhalten.

Hierbei wurde innerhalb von 11 h eine Endkonzentration von 54 g/l 3-HPA erhalten. Die Ausbeute war wie in Phase 1 mit 97 % (mol/mol) sehr hoch. Die volumetrische Produktivität betrug 3,5 g/l h.

In einem ähnlichen Experiment mit geringerer Semicarbazidkonzentration in der ersten Phase (40 g/l) und in der zweiten Phase (62 g/l) war die Bildung von Nebenprodukten höher, woraus eine geringere Ausbeute mit 83 % resultierte mit einer 3-HPA Konzentration von 37 g/l.

Es kann zusammengefasst werden, dass je höher die Semicarbazidkonzentration ist, desto höher ist die erreichte Ausbeute und desto geringer ist die unerwünschte Produktion von Nebenprodukten. Dies kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass Semicarbazid ziemlich toxisch für die Zellen ist und bei höheren Semicarbazidkonzentrationen der Metabolismus

des Bakteriums weitgehend gestoppt wird. Dies kann auch zu der geringeren volumetrischen Produktivität geführt haben.

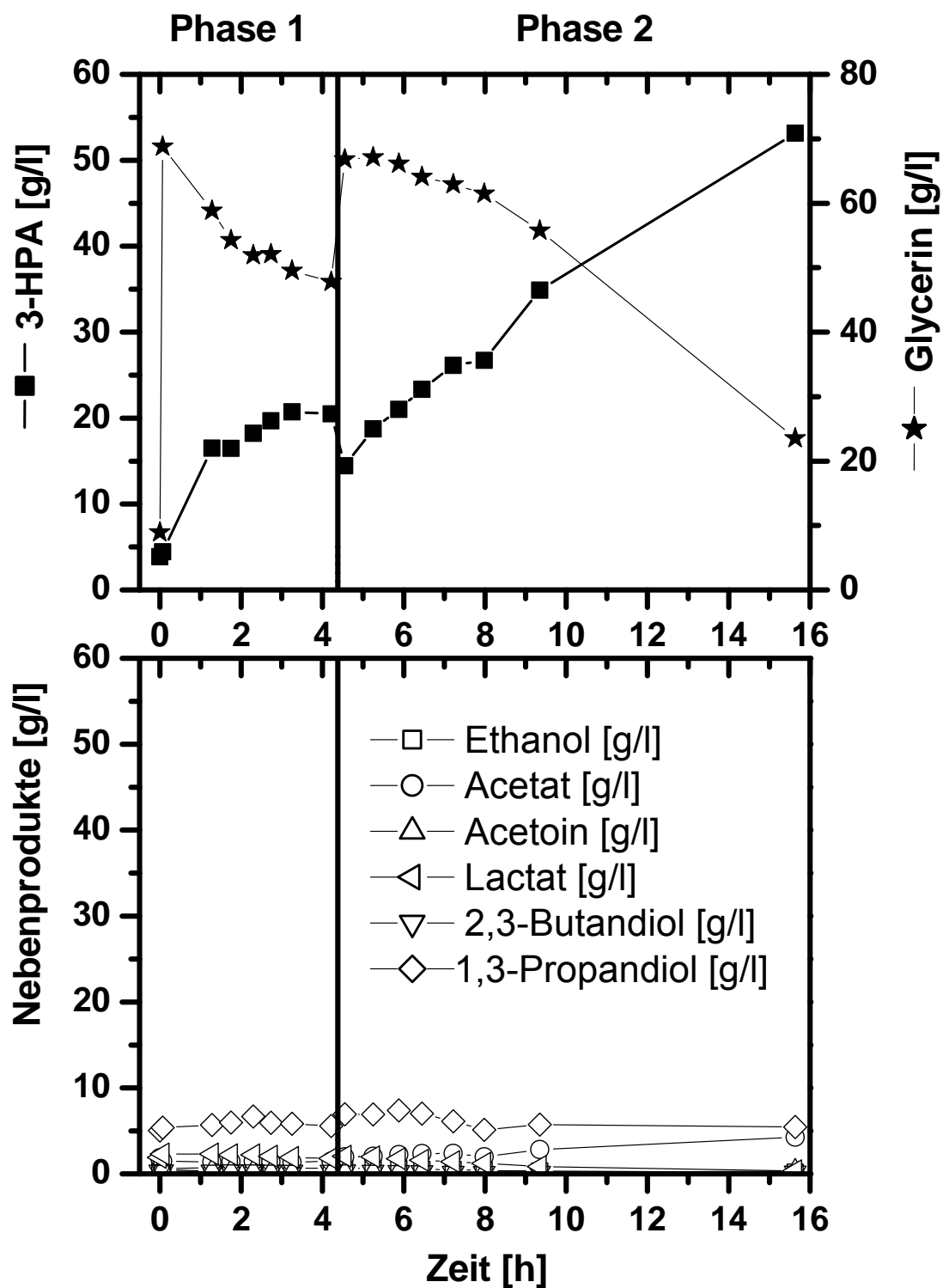


Abbildung 4.13: Optimierung der Biotransformation. Phase 1: Zufütterung von Semicarbazid. Phase 2: Zugabe neuer Biomasse.

Zwischen eingesetzter Semicarbazidkonzentration, volumetrischer Produktivität, Biomassekonzentration und Ausbeute muss also ein optimaler Kompromiss gefunden werden.

Zufütterung von Semicarbazid und Zugabe von neuer Biomasse ist dafür eine geeignete Strategie. Die erreichte 3-HPA Endkonzentration von 54 g/l mit einer Ausbeute von 97 % (mol/mol) sind die bisher höchsten Werte, die bei der biotechnologischen Produktion von 3-HPA erreicht wurden (Tabelle 2.8). Die Bildung von Nebenprodukten konnte erstmals fast vollständig zurückgedrängt werden.



### 4.2.3 Produktion aktiver Biomasse mit Glucose

In diesem Teil der Arbeit sollte aufgezeigt werden, ob die Herstellung hoher Biomassekonzentrationen mit Glucose als Substrat und eine darauf folgende Induktion des *dha*-Regulons mit Glycerin möglich ist.

Glucose liefert im Vergleich zu Glycerin einen weitaus höheren spezifischen Zellertrag. Außerdem war Glucose bisher als Substrat wesentlich kostengünstiger als Glycerin (Grothe, 2000). Es werden allerdings auch Szenarien mit höheren Glucosepreisen beschrieben (BREW, 2006). Um ein möglichst flexibles Verfahren gegenüber Rohstoffpreisschwankungen zu ermöglichen und die bessere Zellausbeute mit Glucose zu nutzen, sollte untersucht werden, ob mit Glucose angezogene Biomasse durch die Zugabe von Glycerin induziert und als aktiver Biokatalysator zur Biotransformation verwendet werden kann.

Die Induzierung der Glycerindehydratase (GDHt) durch Glycerin ist notwendig, da diese durch Glucose reprimiert wird (Kapitel 2.3.2.2.2). Auf sauerstofflimitierende Bedingungen wurde verzichtet, da eine  $pO_2$ -Regelung durch das Auftreten der scheinbaren  $pO_2$ -Problematik nicht möglich war (Kapitel 7).

Eine exponentielle Feedingstrategie nach Korz *et al.* (1995) wurde zur Glucosezufütterung angewendet (Kapitel 3.4.3) mit:

$\mu_{\text{set}}$	= gewählte / eingestellte Wachstumsrate = $0,15 \text{ [h}^{-1}\text{]}$
$V_{t_r}$	= Fermentationsvolumen bei Start der Zufütterung = $2,5 \text{ [l]}$
$X_{t_r}$	= Biomassekonzentration bei Start der Zufütterung = $7,9 \text{ [g l}^{-1}\text{]}$
$t_F$	= Zeitpunkt der Zufütterung [h]
$m$	= Erhaltungskoeffizient = $0,025 \text{ [g g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$
$Y_{X/S}$	= Biomasseausbeutekoeffizient = $0,45 \text{ [g g}^{-1}\text{]}$

Die Biomasseproduktion mit Glucose wurde unter aeroben Bedingungen mit einem  $pO_2$ -Sollwert von 20 % (Luftsättigung) durchgeführt (Abbildung 4.14). Nach 3,6 h wurde die exponentielle Glucosezufütterung gestartet. Diese wurde nach Erreichen von 18 g/l Biotrockenmasse (8,5 h) gestoppt und nur noch mit Stickstoff begast. Gleichzeitig wurde Glycerin zugegeben, so dass eine Anfangskonzentration von 10,6 g/l gegeben war.

Der Fermentationsverlauf kann wie folgt beschrieben werden: Nach Zugabe von Glycerin beginnt die Adaptation an das zweite Substrat Glycerin, gekoppelt mit einer vollständigen Hemmung des Wachstums (lag-Phase). Nach Induktion der Enzyme für das zweite Substrat Glycerin setzte ab Stunde 15 mit exponentieller Rate die Bildung der Gärungsprodukte ein.

Die Biomasse wurde am Anfang (17 h) und in der Mitte der exponentiellen Produktionsphase (21 h) entnommen, um die Aktivität der Biomasse für die Produktion von 3-HPA zu untersuchen.

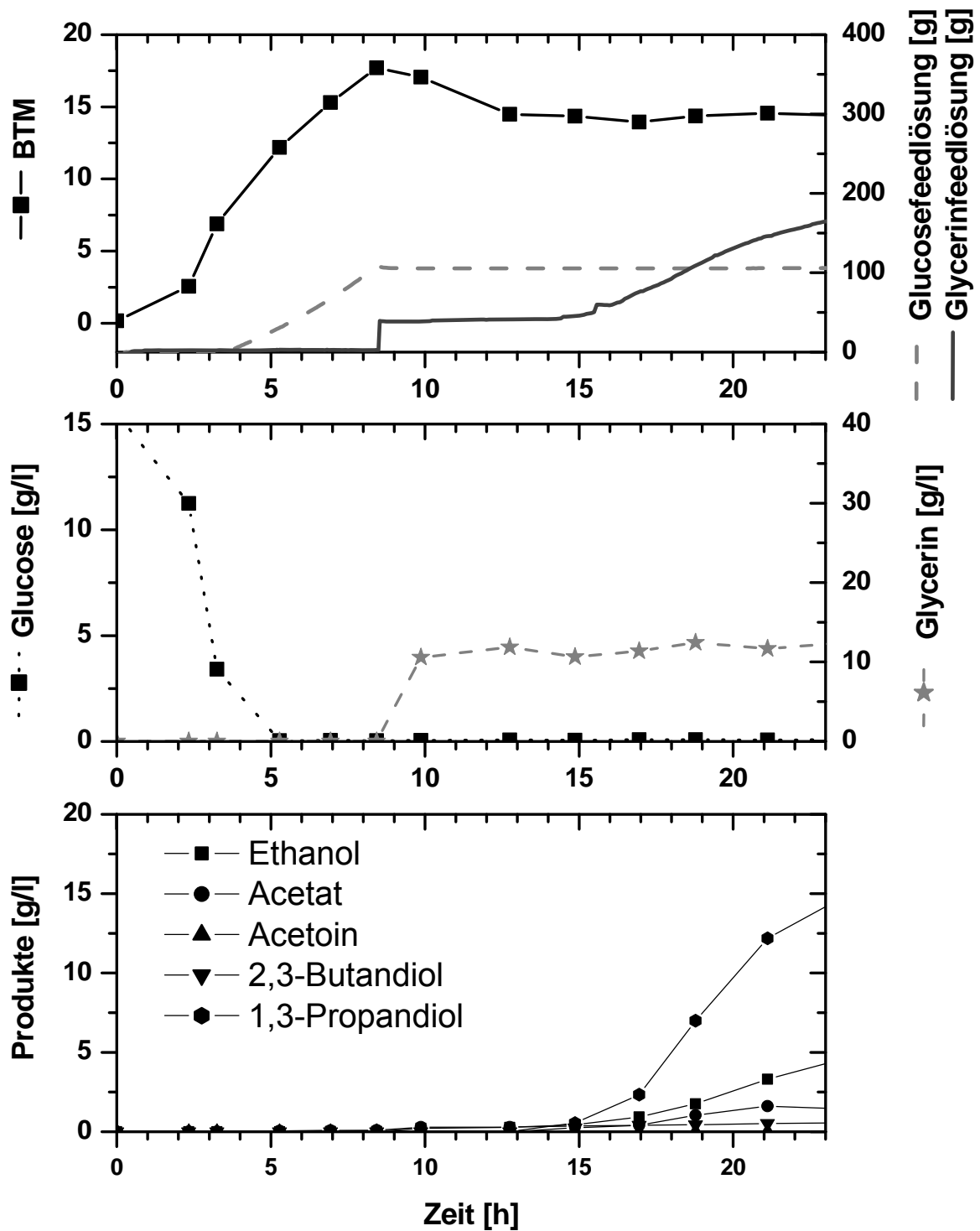


Abbildung 4.14: Hochzelldichtekultur mit Glucose, Produktion von aktiver Biomasse durch Induktion mit Glycerin. Glycerinzugabe nach 8,5 h.

Die Biotransformationsexperimente wurden unter Standardbedingungen (40 g Semicarbazid/l, 30°C, 10 g BTM/l und pH 6) untersucht. Für sauerstofflimitierte Bedingungen wurden Erlenmeyerkolben, für anaerobe Bedingungen anaeroben Flaschen verwendet. Die weitaus aktivere Probe ist die 2. Probe. Hier werden in 5 h max. 10 g/l 3-HPA produziert. Dies entspricht einer volumetrischen Produktivität von 2 g/l h. Unterschiede zwischen anaeroben und sauerstofflimitierenden Bedingungen für die Biotransformation lassen sich bei diesem Experiment nicht erkennen, dies kann sicherlich auf die nur moderate Aktivierung der Biomasse zurückgeführt werden.

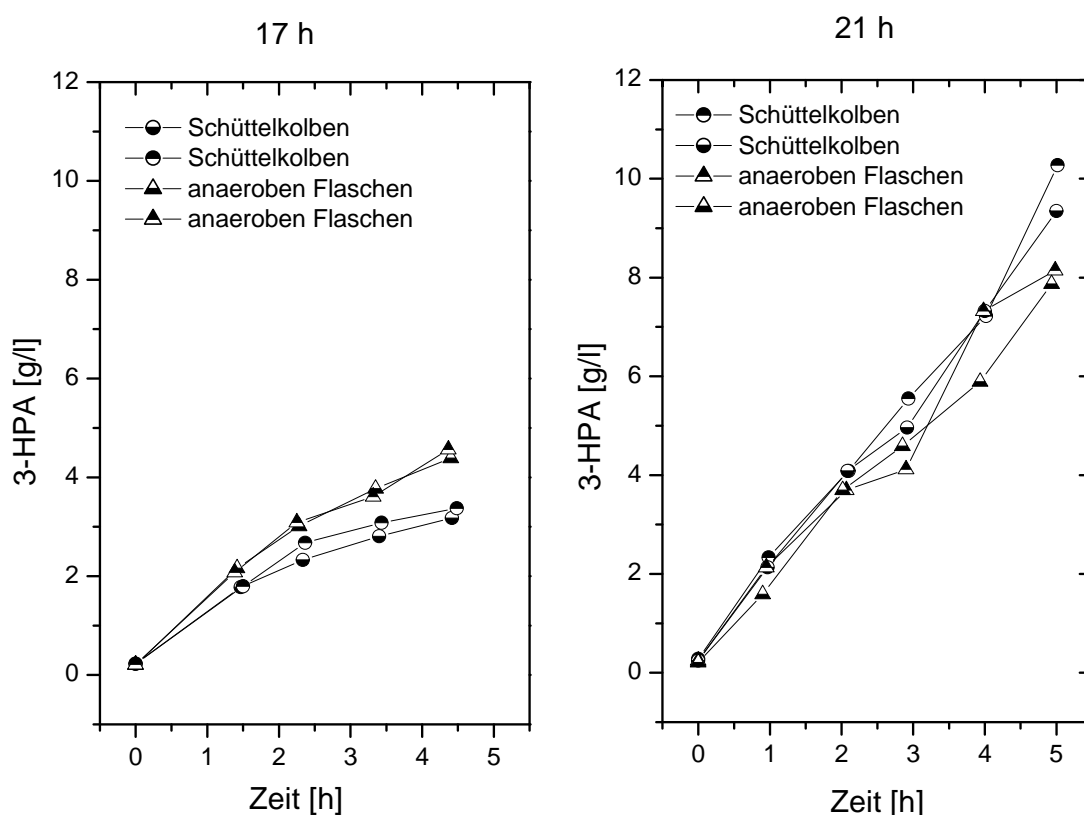


Abbildung 4.15: Vergleich der Aktivität der durch Glycerin induzierten Biomasse.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den vorher beschriebenen Biotransformationsexperimenten mit nur auf Glycerin gewachsenen Zellen (Kapitel 4.1; 4.2.2), zeigt sich, dass nur ein Teil der Biomasse aktiv ist, so dass 3-HPA Konzentration und volumetrische Aktivität geringer ausfallen.

Fazit:

Es kann zusammengefasst werden, dass prinzipiell eine Induktion von mit Glucose produzierter Biomasse möglich ist. Es wurden jedoch nur moderate Konzentrationen an 3-HPA erhalten. Biomasse, die ausschließlich mit Glycerin als Substrat erzeugt wurde, besitzt eine wesentlich höhere Aktivität.

Eine höhere Aktivität der Zellen könnte durch eine geregelte Diauxie erhalten werden, d.h. durch eine überlagerte Zufütterung an Glycerin bereits während der exponentiellen Zufütterung an Glucose. Dies könnte die lange lag-Phase verringern. Die Vitalität der Zellen leidet sicherlich unter der langen Phase, die für die Glycerininduktion benötigt wird.

Hier ging es jedoch vorrangig darum, nachzuweisen, dass auf Glucose gewachsene und mit Glycerin induzierte Zellen aktiv sind und Glycerin zu 3-HPA umsetzen können.

### 4.3 AUFARBEITUNG

Für die wirtschaftliche Bewertung eines biotechnologischen Prozesses sind nicht nur die Fermentation sondern auch die nachfolgenden Aufreinigungsschritte von entscheidender Bedeutung. Der 3-HPA liegt nach der Biotransformation in wässriger Lösung zusammen mit Semicarbazid vor. Es ist bekannt, dass Aldehyde mit Semicarbazid in wässrigen Lösungen unter bestimmten Reaktionsbedingungen Semicarbazone bilden (Houben-Weyl, 1953). Semicarbazone sind in Wasser unlöslich und lassen sich leicht durch Ausfällung aus dem wässrigen Reaktionsansatz gewinnen. Gefälltes Semicarbazon kann dann wieder unter sauren Bedingungen gespalten werden (Houben-Weyl, 1953). Abbildung 4.16. zeigt einen möglichen Aufarbeitungsweg. Nach der Biomasseseparation durch Filtration/Zentrifugation erfolgt die Bildung von 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazon durch Erhitzen auf 100°C. Die Abtrennung des 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazons erfolgt dann aus der wässrigen Lösung ebenfalls durch Filtration/Zentrifugation. Die Aufspaltung des 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazons wird durch Zugabe konzentrierter Säuren erreicht (Slininger und Bothast, 1990). Dieser Aufarbeitungsweg würde einen Großteil der Kosten sparen, die bei der Aufarbeitung biotechnologischer Produkte wie z.B. 1,3-Propandiol bei der Verdampfung des Wassers aus Fermentationsbrühen entstehen.

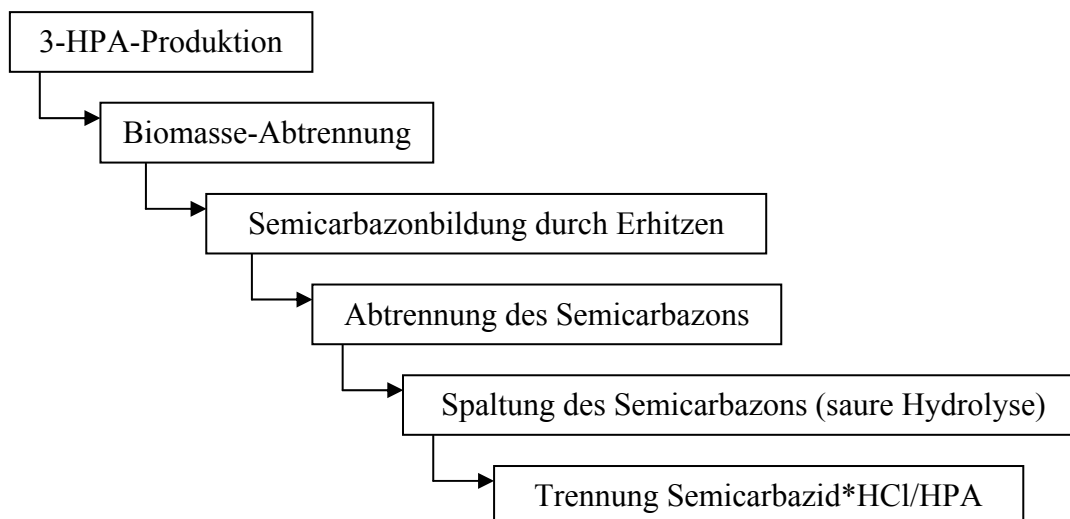


Abbildung 4.16: Vorgehensweise der Aufarbeitung von 3-HPA zur weiteren Verwendung von 3-HPA als Acrolein nach Slininger und Bothast (1990).

Allerdings eignet sich dieser Aufarbeitungsweg nur dann, wenn 3-HPA zu Acrolein umgesetzt werden soll (Slininger und Bothast, 1990), nicht aber zur Verwendung von 3-HPA als Plattformchemikalie zum Beispiel für die Herstellung von 1,3-Propandiol, da bei der Spaltung von 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazon unter sauren Bedingungen (Abbildung 4.17)

Acrolein und 3-HPA in einem ebenfalls säurekatalysierten Gleichgewicht (Abbildung 4.18) stehen und somit ein Teil des 3-HPA als Acrolein verloren ginge.

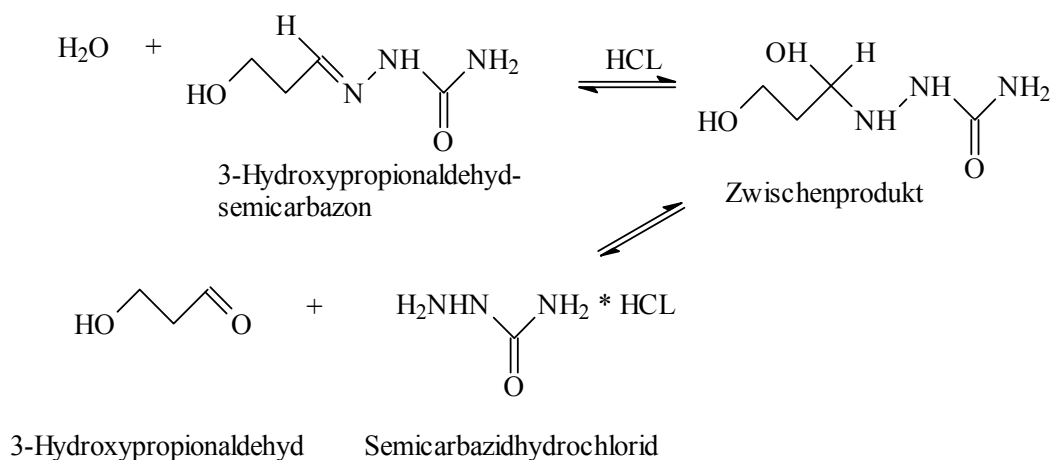


Abbildung 4.17: Säurekatalysierte Spaltung von 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazon.

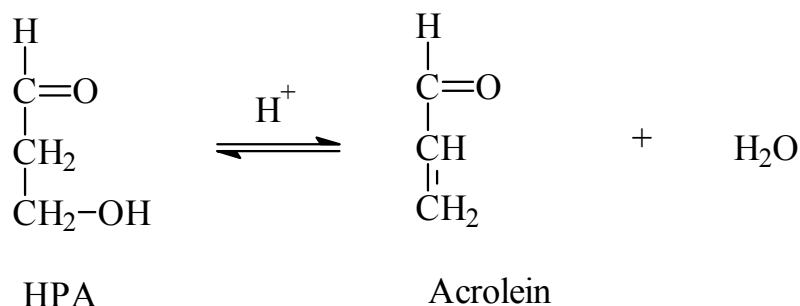


Abbildung 4.18: Säurekatalysierte Hydratation von 3-HPA in Acrolein.

Damit scheidet dieser Aufarbeitungsweg zur Verwendung von 3-HPA als Plattformchemikalie aus (Abbildung 4.19), er ist nur für die Verwendung von 3-HPA als Acroleinprecursor verwendbar, so dass andere Alternativen gesucht werden müssen.

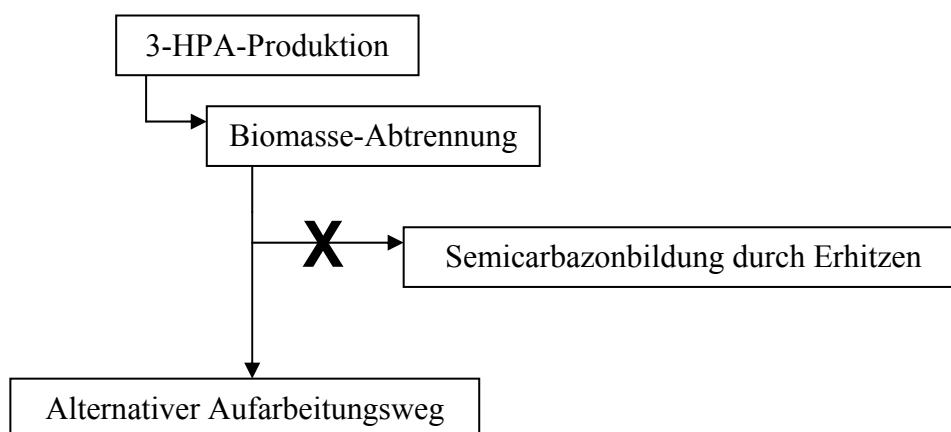


Abbildung 4.19: Suche nach einem alternativen Aufarbeitungsweg

### 4.3.1 Suche nach einem alternativen Aufarbeitungsweg

#### 4.3.1.1 Alternative 1: Destillation

3-HPA kann nach Hall und Stern (1950) bei ca. 38°C und 0,3 mbar (bzw. 0,2 mm HG) abdestilliert werden. Trotz der dabei bisher erhaltenen geringen Ausbeuten sollte diese Methode hier kurz betrachtet werden.

Die Beobachtung, dass der Aldehyd während der Destillation im Vorlagekolben polymerisiert, konnte bestätigt werden. Allerdings konnten die aufgezeigten Ausbeuten von 20 % destilliertem Aldehyd nicht reproduziert werden. Nur max. 1,4 % des eingesetzten Aldehyds wurde als Destillat nachgewiesen (Tabelle 4.3).

Der polymerisierte 3-HPA konnte durch Zugabe von 0,6 m H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gespalten und somit wieder gelöst werden. Zweimalige Zugabe von Säure und anschließende Destillation führte zu einer Abnahme des Aldehyds von 90 % im Vorlagekolben, jedoch nicht zu einer Steigerung der Ausbeute der Destillation. Zur Spaltung des 3-HPA-Polymers wurde Schwefelsäure verwendet, da ein Abziehen von HCl während der Destillation vermieden werden sollte. Die geringe Destillationsausbeute kann auf eine Kondensation bzw. Polymerisierung an der Destillierbrücke zurückgeführt werden.

*Tabelle 4.3: Ergebnisse der Destillation von 3-HPA.*

Destillation	
Wiederfindung H <sub>2</sub> O [%]	97,76
Wiederfindung 3-HPA [%]	82,26
Überdest. 3-HPA [%]	1,39
Verlust 3-HPA [%]	17,74

Dieser Aufarbeitungsweg ist nicht effektiv.

#### 4.3.1.2 Alternative 2: Extraktion

Zur Trennung von Semicarbazid und 3-HPA sollten zwei Extraktionsmittel gesucht werden, in denen nur ein Stoff jeweils gut löslich ist. Aus diesem Grund wurden zuerst einmal exemplarisch die Löslichkeiten beider Stoffe bzw. ihrer Derivate in verschiedenen Lösungsmitteln betrachtet (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Zusammenstellung der Löslichkeiten der betrachteten Stoffe.

	Wasser	Alkohole				Diethylether	Benzol
		MeOH	EtOH	PD	Isobut		
<b>Semicarbazid</b>	lösl <sup>1, 2</sup>		lösl <sup>1, 2</sup>			unlös <sup>1, 2</sup>	unlös <sup>1, 2</sup>
<b>Semicarbazid-Hydrochlorid</b>	lösl <sup>1, 2</sup>		unlös <sup>1, 2</sup>			unlös <sup>1, 2</sup>	unlös <sup>1</sup>
<b>Semicarbazon</b>	lösl <sup>3</sup>	lösl <sup>3</sup>	lösl <sup>3</sup>	unlös <sup>5</sup>	unlös <sup>5</sup>	schwerlös <sup>3</sup>	unlös <sup>3</sup>
<b>20°C</b>							
<b>3-HPA</b>	lösl <sup>3</sup>	lösl <sup>3</sup>	lösl <sup>3</sup>	lösl <sup>3</sup>	lösl <sup>3</sup>	schwerlös <sup>3</sup>	
<b>Acrolein</b>	lösl <sup>4</sup>	lösl <sup>4</sup>				lösl <sup>4</sup>	
<b>Löslichkeit in</b>		lösl <sup>1</sup>	lösl <sup>1</sup>	100 <sup>1</sup>	85 <sup>1</sup>	69 <sup>1</sup>	1,770 <sup>1</sup>
<b>Wasser [g/l] 20°C</b>							

Legende:

lösl:        löslich  
 unlösl:    unlöslich  
 MeOH:     Methanol  
 EtOH:      Ethanol  
 Isobut:    Isobutanol

Indices:

1:    Rathway (1989)  
 2:    CD Römpf (1995)  
 3:    Nef (1904)  
 4:    Weast (1990)  
 5:    Eigene Werte

Werte für Semicarbazon am Beispiel:  
Acetonsemicarbazon

Es zeigt sich, dass nur die Trennung von Semicarbazidhydrochlorid und 3-HPA möglich ist, es muss also angesäuert werden. Erfolgt das Ansäuern mit einer äquivalenten Menge an HCl, so dass alles Semicarbazid als Salz vorliegt, kann Isobutanol wegen seiner begrenzten Mischbarkeit mit Wasser als das geeignete Extraktionsmittel der Wahl gelten. Da für 3-HPA nur eine geringe Datendichte besteht, wurde für 3-HPA als gelösten Stoff bzw. für Isobutanol als Extraktionsmittel bei Raumtemperatur nach folgender Gleichung der Nernst'sche Verteilungskoeffizient (K) ermittelt:

$$K = \frac{c_{\text{HPA}}(\text{Isobutanol})}{c_{\text{HPA}}(\text{Wasser})} = \frac{c_{\text{HPA}}(\text{Isobutanol})}{c_{\text{HPA}}(\text{Wasser})} = \frac{0,83}{1,24} = 0,67 \quad \text{Gl. 4.1}$$

Nach Rottig *et al.* (1978) kann in Isobutanol gelöstes 3-HPA mit guter Ausbeute unter Einsatz von Nickelkatalysatoren zu 1,3-Propandiol hydriert werden.

Allerdings besteht auch hier wieder das Problem des säurekatalytischen Gleichgewichts zwischen Acrolein und 3-HPA (Abbildung 4.18), da nur Semicarbazidhydrochlorid und 3-HPA getrennt werden können, es muss also angesäuert werden.

Eine Aufkonzentrierung der Semicarbazid/3-HPA-Lösung vor der Extraktion ist durch Gefriertrocknung möglich (Tabelle 4.5). Diese Methode führte zu einer 89 %-igen Polymerisierung des Aldehyds. Der Verlust an Aldehyd betrug 11 %.



Tabelle 4.5: Ergebnisse der Gefriertrocknung von wässriger 3-HPA-Lösung.

Gefriertrocknung	
Wiederfindung H <sub>2</sub> O [%]	0
Wiederfindung 3-HPA [%]	89,3
Überdestilliert 3-HPA [%]	0
Verlust 3-HPA [%]	10,7

#### 4.3.1.3 Alternative 3: Verdrängungsreaktion

Es ist bekannt, dass eine Regenerierung der Carbonylgruppe von Semicarbazonen durch eine Verdrängungsreaktion mit reaktionsfreudigeren Aldehyden möglich ist (Houben-Weyl, 1953). Dies kann ein möglicher Weg zur Trennung von Semicarbazid/3-HPA sein. Um diese Möglichkeit zu prüfen wurde zuerst die 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazonbildung näher untersucht.

##### 4.3.1.3.1 Untersuchungen zur Semicarbazonbildung

Slininger und Bothast sprechen von einem chemischen Abfangen von 3-HPA, der genaue Mechanismus wurde nicht beschrieben. Sie gehen von einer Reaktion von 3-HPA mit Semicarbazid aus (Slininger und Bothast, 1985). Daher soll als erstes der Mechanismus des Abfangens bzw. der Semicarbazonbildung untersucht werden.

Zur Klärung der Frage, ob der Mechanismus auf Semicarbazonbildung beruht, wurde Bio-transformationspuffer mit einer 3-HPA-Lösung versetzt und jeweils 10 ml in Falconröhrchen für die Messung einer Kinetik in ein Wasserbad bei 30°C verbracht. Verdünnungen bzw. Konzentration der Lösungen wurden so gewählt, dass gegenüber 3-HPA eine 4,25-fach höhere Semicarbazidkonzentration vorlag. Die 3-HPA Konzentration betrug 340 mM. Das Lösungsgemisch wurde auf vorher ausgewogenen und getrockneten Röhrchen verteilt. Nach unterschiedlicher Reaktionszeit (s. Abbildung 4.21) wurden die Röhrchen für 1 h ins Eisbad verbracht, aufgeschüttelt und für 60 min bei 9000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Sie wurden dann einmal mit Wasser gewaschen und für 60 min bei 9000 rpm bei 4°C abzentrifugiert.

Anschließend wurden sie nochmals mit Ethanol gewaschen, getrocknet und gewogen. Der Überstand wurde mit dem 3-HPA-Test nach Circle *et al.* (1945) vermessen. Es konnte wie erwartet innerhalb von 16 h keine Semicarbazonbildung nachgewiesen werden. Das Abfangen des 3-HPA's kann also nicht auf der Bildung des Semicarbazons basieren. Es ist jedoch bekannt, dass Semicarbazone über ein Zwischenprodukt gebildet werden (Jencks, 1959) (Abbildung 4.20).

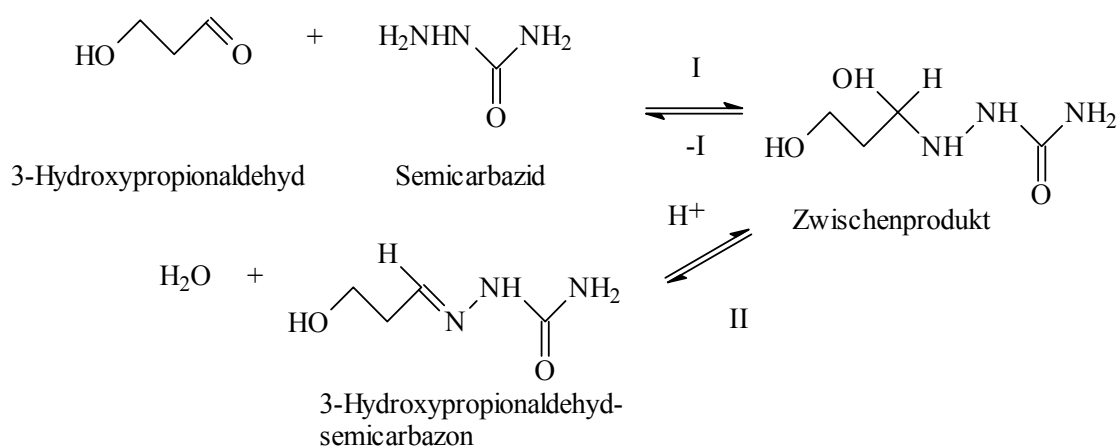


Abbildung 4.20: Reaktionsschema zur Semicarbazonbildung.

Dabei ist bei neutralem pH-Wert die Dehydrierung (II) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Jencks, 1959, 1994). Dieser Befund wie auch die Ergebnisse von Slinger und Bothast (1985), die eine starke pH-Abhängigkeit des Abfangens von 3-HPA beschrieben haben, deuten stark darauf hin, dass das chemische Abfangen des 3-HPA's auf der Bildung des Zwischenproduktes beruht (Abbildung 4.20; I, -I), so dass die Aldehydgruppe maskiert ist.

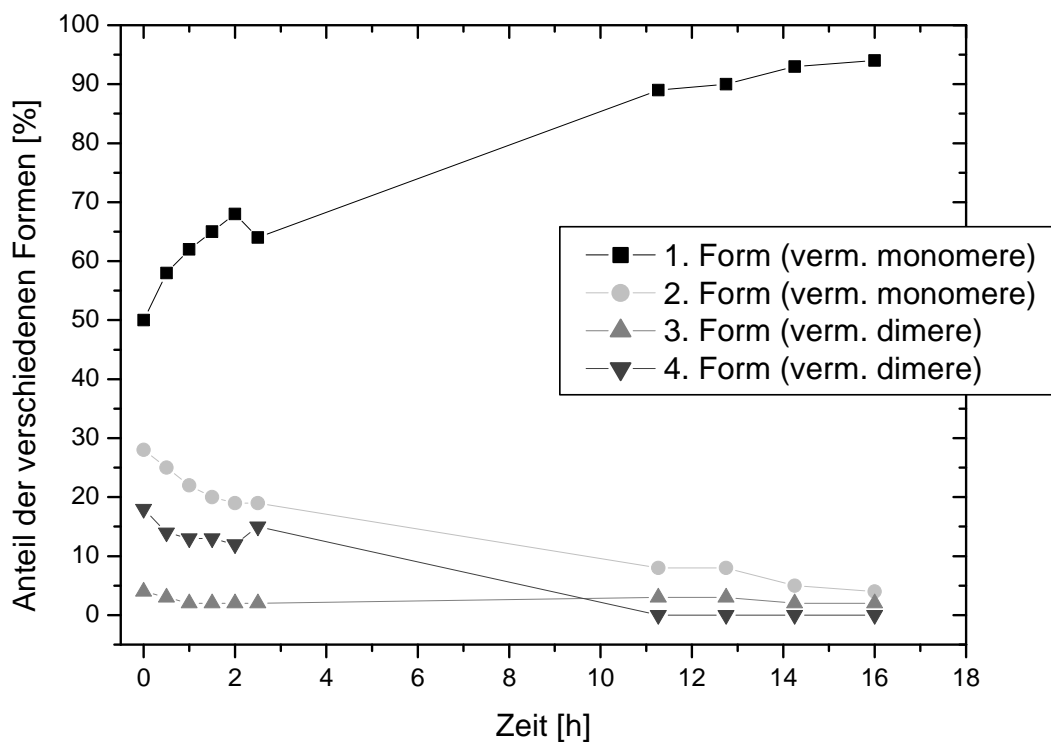


Abbildung 4.21: Dynamisches System 3-HPA in wässriger Lösung bei 30°C. (verm. = vermutlich).

Die weitere Reaktion zu 1,3-Propandiol ist dann blockiert. Dies würde auch die Beobachtung bestätigen, dass bei Zufütterung von Semicarbazid kein Nebenprodukt bzw. 1,3-Propandiol entsteht.

Vermisst man die mit steigender Reaktionszeit erhaltenen Proben im GC, erkennt man, dass sich das 3-HPA-System dynamisch verhält (Vollenweider *et al.*, 2003). Es können vier verschiedene Formen unterschieden werden (Abbildung 4.21), von denen zwei vermutlich Monomere und zwei Dimere/Polymere waren und deren Verhältnis sich mit der Reaktionszeit änderte.

Insofern kann auch ein GC bzw. ein GC-MS zur Identifizierung der Dynamik des 3-HPA-Systems in wässriger Lösung verwendet werden.

Untersucht man die 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazonbildung bei 90°C (Versuchsanordnung wie oben beschrieben) zeigt sich, dass innerhalb von 9 min 118 mM Semicarbazon gebildet wird (Abbildung 4.22). Dies entspricht 33 % der eingesetzten 3-HPA-Konzentration.

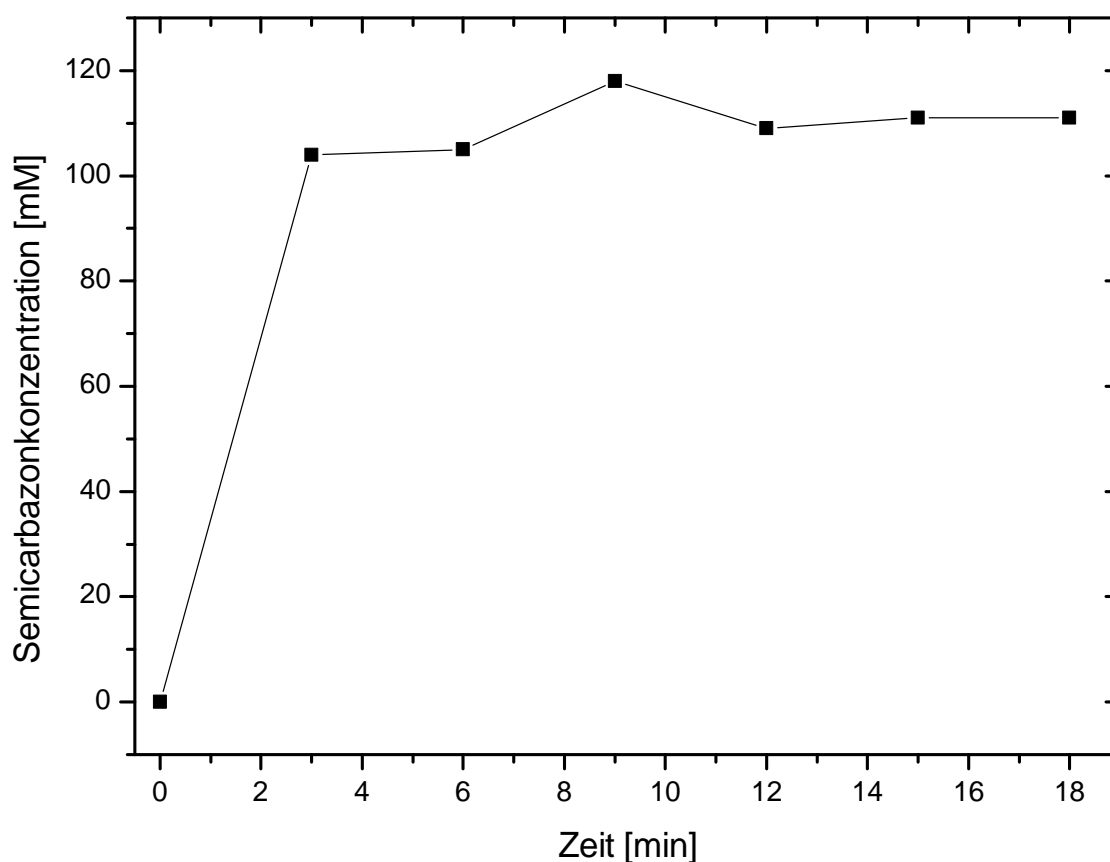


Abbildung 4.22: Kinetik der Semicarbazonbildung bei 90°C.

Die 3-Hydroxypropionaldehydsemicarbazonbildung ist demnach nur bei hohen Temperaturen möglich.

#### 4.3.1.3.2 Untersuchung der Verdrängungsreaktion mit Aceton

Wie beschrieben, liegen 3-HPA und Semicarbazid im Biotransformationspuffer in freier Form oder als Zwischenprodukt der Semicarbazonbildung vor. Somit erscheint eine Verdrängungsreaktion mit einem reaktiveren Aldehyd leicht möglich. Um einen sinnvollen Aufarbeitungsweg zu ermöglichen wurde Aceton zur Untersuchung der Verdrängungsreaktion gewählt, da Aceton nach Houben-Weyl (1953) sehr reaktiv erscheint und einen niedrigen Siedepunkt (56,1°C) hat.

Hierzu wurde ein Semicarbazidpuffer erst mit 3-HPA, dann mit Aceton versetzt. Die Nullprobe wurde sofort nach Zugabe von Aceton genommen. Die finale Reaktionslösung bestand aus 172 mM Semicarbazid, 308 mM 3-HPA und 13,6 M Aceton. Aceton lag damit im großen Überschuss vor. Die Lösung wurde in 50 ml Falkonröhrchen (3 Parallelen) gefüllt und im Wasserbad bei 30°C unter Schütteln reagieren gelassen. Die Reaktionszeit betrug 1 h bzw. 21,5 h. Zur Auswertung wurden sowohl die Semicarbazidkonzentration als auch die 3-HPA-Konzentration gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.6. Es konnte eine maximale Ausbeute von 84 % (mol/mol) an Acetonsemicarbazon erzielt werden, ohne einen Verlust von 3-HPA.

*Tabelle 4.6: Ergebnisse der Ausfällung bzw. Verdrängungsreaktion mit Aceton.*

Zeit	1 h	21,5 h
Eingesetzte Konzentration an Semicarbazid in mM	172,3	172,3
Abreagierte Konzentration an Semicarbazid in mM	123,9	145,0
Ausbeute [%]	71,3	84,1
Eingesetzte Konzentration an 3-HPA in mM	154,0	154,0
Abreagierte Konzentration an 3-HPA in mM	0	0
Verlust [%]	0	0

Die Falkonröhrchen wurden nach der Reaktion im Eisbad abgekühlt und für 1,5 h bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert.

Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und die Proben bei 80°C getrocknet.

Zum Nachweis, dass tatsächlich nur Acetonsemicarbazon und kein Hydroxypropionaldehydsemicarbazon entstanden ist, wurde das entstandene Semicarbazon mit 10 ml 0,6 m HCl unter Erwärmen gespalten und eine 3-HPA Bestimmung durchgeführt. Es konnte kein 3-HPA nachgewiesen werden.

Generell konnte damit gezeigt werden, dass eine Regenerierung des Semicarbazids ohne Verlust von 3-HPA möglich ist. Somit ist die Verdrängungsreaktion mit Aceton die Alternative, die sich am besten zur Aufarbeitung von 3-HPA eignet.

Abbildung 4.23 zeigt das Flussdiagramm eines solchen Aufarbeitungswegs. Zuerst erfolgt die Bildung des Acetonsemicarbazons durch Zugabe von Aceton. Diese Bildung läuft wie gezeigt bei Raumtemperatur ab. Das entstehende Acetonsemicarbazon kann durch Filtration bzw. Zentrifugation abgetrennt werden und unter Zugabe von Säure wieder in seine Bestandteile Aceton und dem entsprechenden Salz des Semicarbazids regeneriert werden. Diese Regeneration wird am besten als Reaktivdestillation durchgeführt, da Aceton einen relativ geringen Siedepunkt von 56°C aufweist und das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung der Edukte

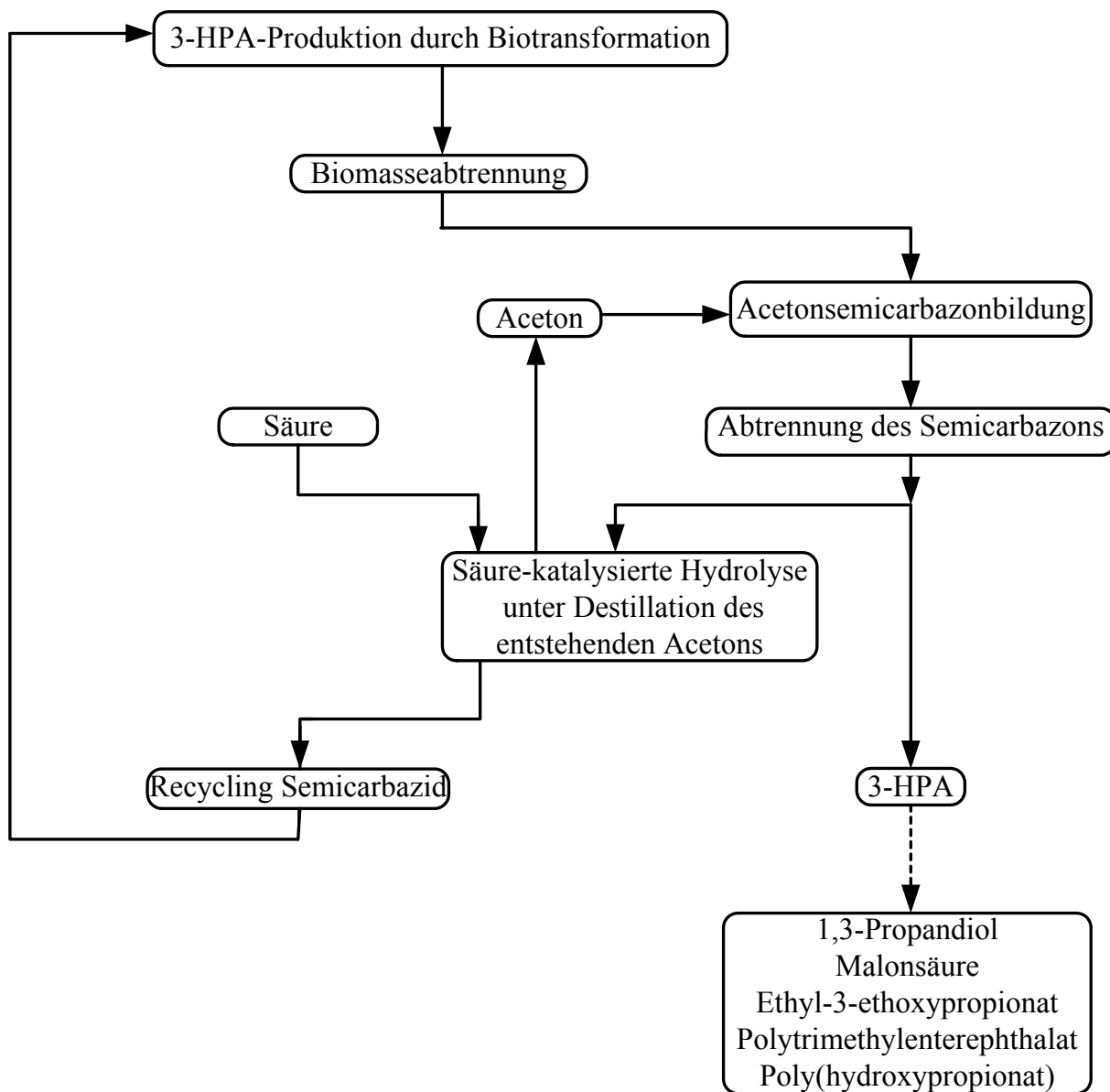


Abbildung 4.23: Aufarbeitungsweg für 3-HPA durch die Verdrängungsreaktion mit Aceton.

gezogen wird. Sowohl das Semicarbazid als auch das Aceton können dabei in den Prozess zurückgeführt werden.

#### 4.3.2 Aufarbeitungswege nach Wahl der Folgeprodukte

Die Aufarbeitung richtet sich nach dem Produkt, das aus 3-HPA gewonnen werden soll.

Für die Produktion von Acrolein können zwei Wege beschrieben werden:

Zum einen kann der bereits beschriebene Weg vollzogen werden: Hydroxypropionaldehydsemicarbazon kann unter starkem Erhitzen erzeugt und das wasserunlösliche Semicarbazon dann durch Zentrifugation/Filtration abgetrennt werden. Dieses kann anschließend durch Spaltung mit Säuren in 3-HPA bzw. Acrolein überführt werden. Zweckmäßig wird man sich hier einer Reaktivdestillation des Acroleins (Siedepunktkurve siehe Abbildung 4.24) bedienen.

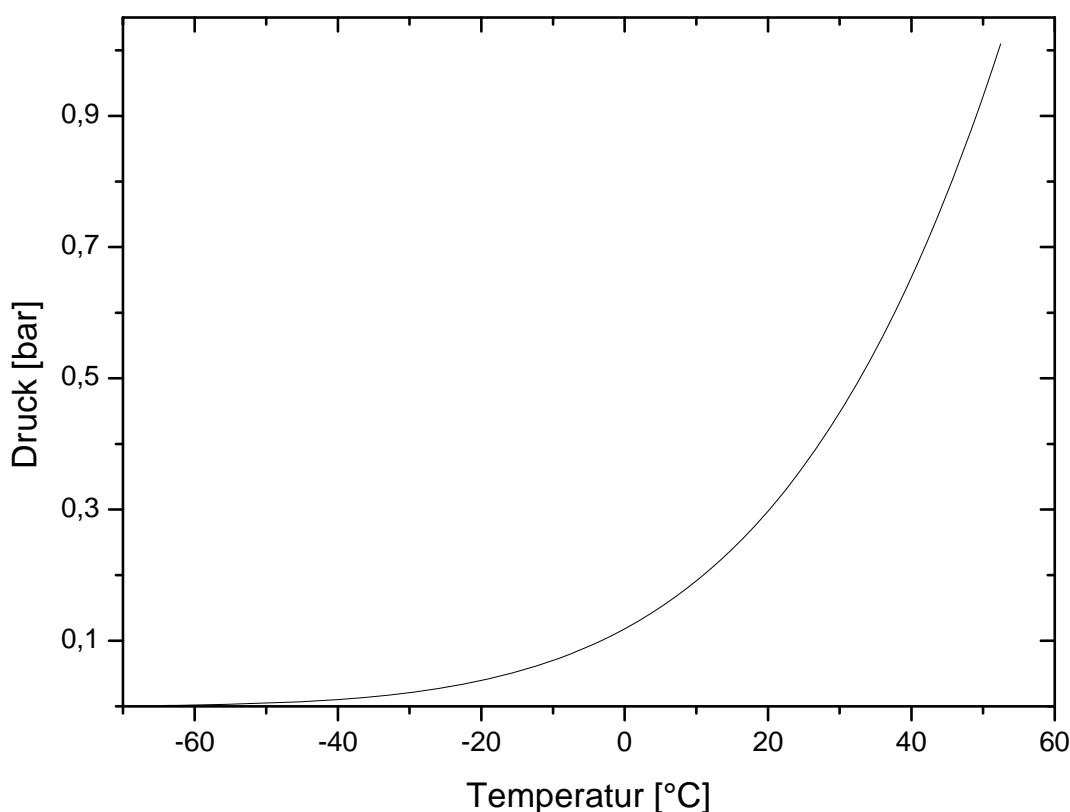


Abbildung 4.24: Siedepunktkurve des Acroleins nach NIST Chemistry Webbook (2000).

Man erkennt, dass Acrolein bei Normaldruck einen Siedepunkt von 53°C hat. Somit ist eine destillative Abtrennung ohne großen energetischen Aufwand möglich.

Abbildung 4.25 zeigt das Flussdiagramm dieses Prozesses.

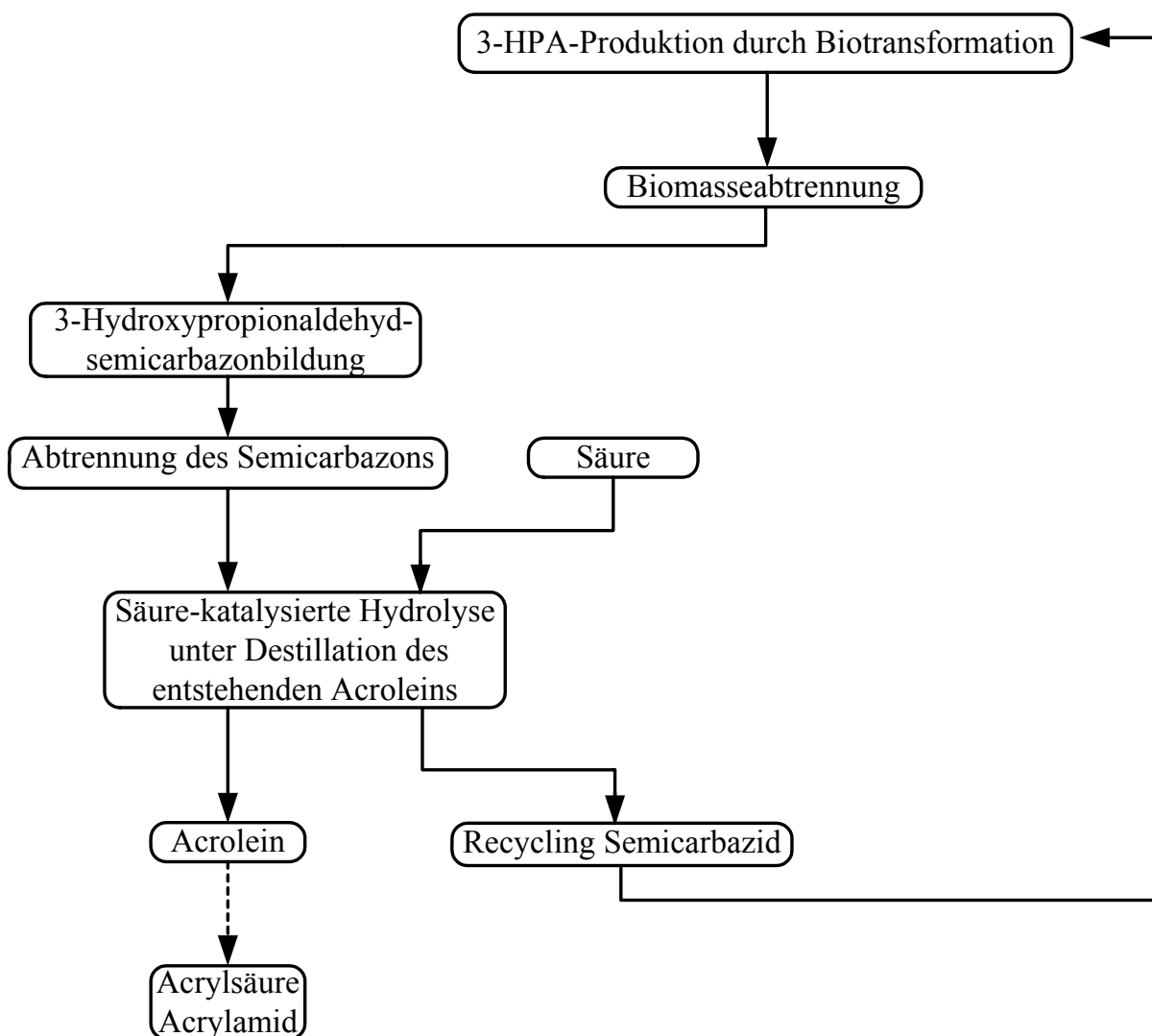


Abbildung 4.25: 1. Aufarbeitungsweg von 3-HPA zur Verwendung als Acrolein.

Zum anderen kann Acrolein auch ohne die intermediäre Bildung von Semicarbazon erzeugt werden:

Die Semicarbazid/3-HPA Lösung wird einfach nach Abtrennung der Biomasse angesäuert, so dass sich das säurekatalysierte Gleichgewicht zwischen 3-HPA und Acrolein einstellt (Abbildung 4.18). Eine Spaltung ist nicht nötig, da 3-HPA und Semicarbazid in freier Form oder als Zwischenprodukt der Semicarbazonbildung vorliegen. Auch hier verbindet man das Ansäuern am besten mit einer Reaktivdestillation. Abbildung 4.24 zeigt, dass das entstehende Acrolein dann ohne Probleme abdestilliert werden kann. Diese Alternative bietet sowohl die einfachste Aufarbeitungsart wie auch den geringsten Energieaufwand für die Produktion von Acrolein. Abbildung 4.26 zeigt diesen Aufarbeitungsweg.

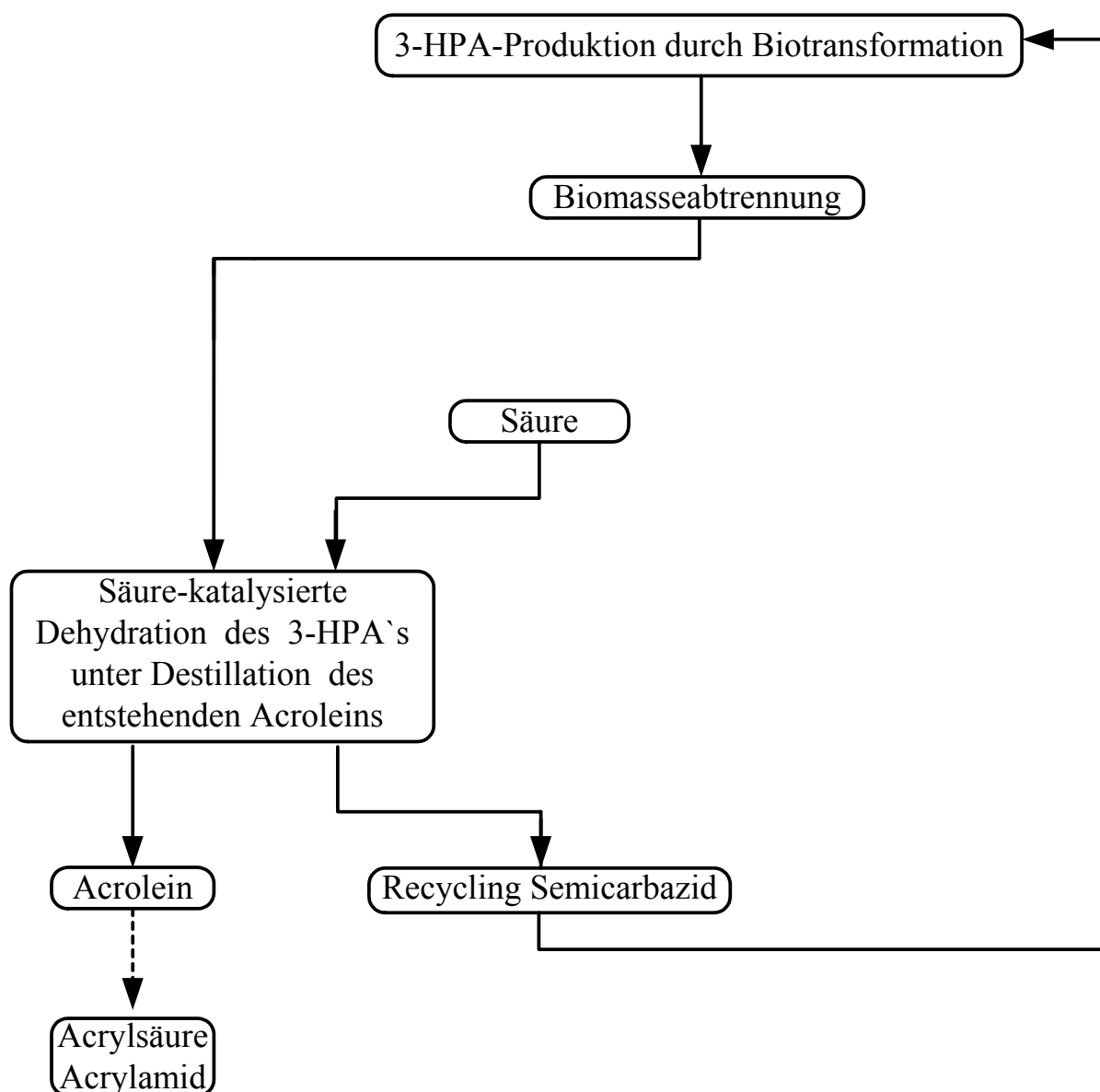


Abbildung 4.26: 2. Aufarbeitungsweg für 3-HPA zur Verwendung als Acrolein.

Abbildung 4.27 gibt einen vergleichenden Überblick über die Aufarbeitungswege, die sich für die verschiedenen Folgeprodukte anbieten. Unter 1 wird der Weg für die Aufarbeitung zum 3-HPA beschrieben, daraus können die Folgeprodukte wie z.B. 1,3-Propandiol oder Malonsäure synthetisiert werden. Die Aufarbeitungsmöglichkeiten von 3-HPA als Acroleinprecursor werden unter Punkt 2 bis 3 zusammengefasst. Hier können als Folgeprodukte z.B. Acrylamid oder Acrylsäure synthetisiert werden.



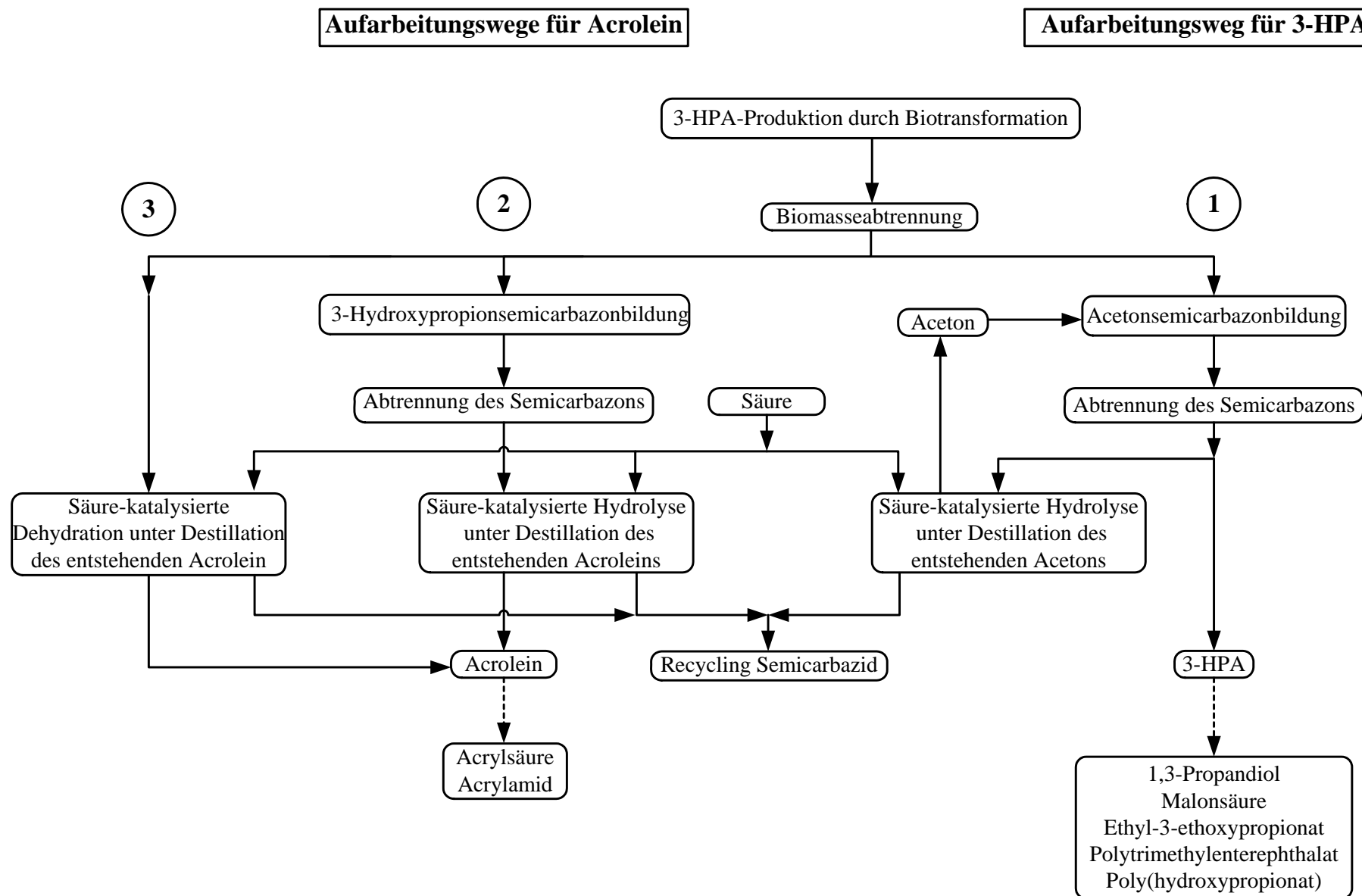


Abbildung 4.27: Verschiedene Aufarbeitungswege für 3-HPA als Plattformchemikalie, je nach gewünschtem Produkt.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

3-Hydroxypropionaldehyd (3-HPA) ist eine industriell interessante Grundchemikalie, die als Ausgangsstoff für zahlreiche Folgeprodukte wie z.B. 3-Hydroxypropionsäure, Acrylsäure, Acrylamid und Malonsäure einsetzbar ist. Seit einiger Zeit ist diese Substanz auch über einen biotechnologischen Prozess mit *Klebsiella pneumoniae* zugänglich, der sich die Vergärung von Glycerin zu 1,3-Propandiol zunutze macht und bei dem 3-HPA als Zwischenprodukt auftritt. Dabei wird zunächst Zellmasse mit Glycerin als Substrat angezogen. Diese setzt dann in einer zweiten Stufe, dem Biotransformationsschritt, weiteres Glycerin in Gegenwart von Semicarbazid zu 3-HPA um. Semicarbazid fängt 3-HPA ab und verhindert so die Weiterreaktion zu 1,3-Propandiol.

In dieser Arbeit ging es vor allem darum, die Zellmasseproduktion in der ersten Stufe und die Biotransformation in der zweiten Stufe zu optimieren. Außerdem sollten interessante Aspekte des Verfahrens, wie der Mechanismus der Abfangreaktion und die Aufarbeitung von 3-HPA aus dem Reaktionsansatz untersucht werden.

Für die Zellmasseproduktion lieferten sauerstofflimitierende Bedingungen die aktivsten Zellen für die Biotransformation. Eine Endkonzentration von 35 g/l 3-HPA und eine Ausbeute von 72 % (mol/mol) wurden dabei erreicht. Unter voller Belüftung angezogene Zellen setzten praktisch kein Glycerin um, während mit anaerob angezogener Zellmasse die 3-HPA-Konzentration unterhalb des Optimums blieb.

Im Fed-Batch-Verfahren konnte die Zellmasseausbeute durch eine geeignete Zufütterungsstrategie von Glycerin beträchtlich gesteigert werden (7 g/l im Vergleich zu 4,8 g/l im normalen Batch). Jedoch trat hier nach kurzem Anfangswachstum eine längere lag-Phase auf, die durch Ausscheidung von toxischem 3-HPA verursacht war. Die Hemmung konnte durch verstärkte Zufütterung von Hefeextrakt vermieden werden.

Anzucht mit Glucose, die mehr Zellmasse liefert, eignete sich nach an die Fermentation anschließende Induktion mit Glycerin ebenfalls zur Gewinnung aktiver Zellmasse, jedoch war die Biotransformationsleistung geringer als mit ausschließlich auf Glycerin gewachsenen Zellen.

Zur Optimierung der Biotransformation wurde in einer ersten Phase die Semicarbazidkonzentration kontinuierlich von 40 auf 92 g/l erhöht, später bei konstanter Semicarbazidkon-

zentration zusätzlich noch neue aktive Zellmasse und Glycerin zugegeben. Dabei wurde eine 3-HPA-Konzentration 54 g/l und eine Ausbeute von 97 % (mol/mol) erreicht. Dies sind die höchsten in der Literatur berichteten Werte.

Es konnte gezeigt werden, dass die Abfangreaktion von 3-HPA mit Semicarbazid bei Reaktionstemperatur in der Biotransformation nicht auf dem unlöslichen Endprodukt Semicarbazon, sondern auf dem löslichen Zwischenprodukt beruht.

Wichtig für eine eventuelle industrielle Anwendung ist ein gutes Aufarbeitungsverfahren. Da 3-HPA wie alle Aldehyde leicht polymerisiert, ist eine destillative Trennung des Aldehyds aus dem Biotransformationspuffer nicht möglich, deshalb wurde nach alternativen Aufarbeitungswegen gesucht. Für Synthesen, die von Acrolein ausgehen wurden zwei Aufarbeitungswege beschrieben: 1. Bildung des 3-Hydroxypropionsemicarbazons mit anschließender saurer Hydrolyse und Destillation des entstehenden Acroleins; 2. Ansäuerung des Reaktionspuffers und destillativer Abtrennung des entstehenden Acroleins. Für Synthesen, die direkt vom 3-HPA ausgehen, erwies sich die Verdrängung aus dem Semicarbazidkomplex mit Aceton mit einer Ausbeute von 84 % als gut geeignet, wobei auch das Semicarbazid wiedergewonnen werden konnte.

Durch diese Untersuchungen konnte das biotechnologische Verfahren zur 3-HPA-Produktion im Hinblick auf eine industrielle Anwendung entscheidend weiterentwickelt werden.

---

## 6 LITERATUR

---

- Abbad-Andaloussi, S., Manginot-Durr, C., Amine, J., Petitdemange, E., and Petitdemange, H. (1995). Isolation and Characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 Mutants with Increased Resistance to 1,3-Propanediol and Altered Production of Acids. *Applied and Environmental Microbiology* 61:4413-4417.
- Abeles, R. H., Brownstein, A. M., and Randle, C. H. (1960).  $\beta$ -Hydroxypropionaldehyde, an intermediate in the formation of 1,3-Propanediol by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* 41:531-530.
- ADAC (2008). Im Biosprit-Rausch. München. ADAC Verlag GmbH. *ADAC Motorwelt*. 4:47-52.
- Adkesson, D., Alsop, A. W., Ames, T., Chu, L., Disney, J. M., Dravis, B. C., Fitzgibbon, P., Gaddy, J. M., Gallagher, F., Lehnhardt, W. F., Lievense, J. C., Luyben, M. L., Seapan, M., Trotter, R. E., Wenndt, G. M., and Yu, E. K. (2004). Purification of biologically-produced 1,3-propanediol. (WO2004101479).
- Agenda 21 (1992). Konferenz der Vereinten Nationen für Umwelt und Entwicklung. Rio de Janeiro
- Agenda 2000 (1999). Agenda 2000 - Stärkung und Erweiterung der Europäischen Union. Entwurf einer für die breite Öffentlichkeit bestimmten Informationsbroschüre der Kommission über die Agenda 2000. Vorrangiges Veröffentlichungsprogramm 1999, X/D/5.
- Ames, T. T. (2002). Process for the isolation of 1,3-propanediol from fermentation broth. (US6361983 B1)
- Arntz, D. (1991). Method of preparing 1,3-propanediol. (US5015789).
- Arntz, D., Haas, Th., Müller, A., and Wiegand, N. (1991). Kinetische Untersuchung zur Hydratisierung von Acrolein. *Chem.-Ing.-Tech.* 63:733-735.
- Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S., and Takagi, H. (2005). Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Appl Environ Microbiol* 71:4149-4152.
- Bachovchin, W. W., Eagar R.G., and Richards J.H. (1977). Mechanism of action of adenosylcobalamin: glycerol and other substrate analogues as substrates and inactivators for propanediol dehydratase - kinetics, stereospecificity, and mechanism. *Biochemistry* 16:1082-1092.
- Baniel, A. M., Jansen, R., and Vitner, A. B. A. (2004). Process for producing 1, 3-propanediol. (WO2004101437).
- Barbirato, F., Grivet, J. P., Soucaille, P., and Bories, A. (1996). 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species. *Appl Environ Microbiol* 62:1448-1451. Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Institut National de la Recherche Agronomique, Narbonne, France.
- Barrett, E. L. and Clark, M. A. (1987). Tetrathionate reduction and production of hydrogen sulfide from thiosulfate. *Microbiological Reviews* 51:192-205.

- Biebl, H., Marten, S., Hippe, H., and Deckwer, W.-D. (1992). Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:592-597.
- Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P., and Deckwer, W. D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 52:289-297.
- Blair-House Abkommen (1992). Blair-House Abkommen im Rahmen der Uruguay-Runde der GATT-Verhandlungen.
- BMF - Bundesministerium der Finanzen. (2007). Steigende Nahrungsmittelpreise und der Boom bei den Biokraftstoffen. *Monatsbericht des BMF* November 2007:79-84.
- BREW-Project. (2006). Medium and Long-Term Opportunities and Risks of the Biotechnological Production of Bulk Chemicals from Renewable Resources - The potential of white biotechnology. <http://www.chem.uu.nl/brew/>.
- Broekhuis, R. R., Lynn, S., and King, C. J. (1994). Recovery of propylene glycol from dilute aqueous solutions via reversible reaction with aldehydes. *Ind.Eng.Chem.Res.* 33:3230-3237.
- Broekhuis, R. R., Lynn, S., and King, C. J. (1996). Recovery of propylene glycol from dilute aqueous solutions by complexation with organoboronates in ion-pair extractants. *Ind.Eng.Chem.Res.* 35:1206-1214.
- Bulthuis, B., Gatenby, A. A., Haynie, S., Hsu, A. K. H., and Lareau, A. D. (1998). Method for the production of glycerol by recombinant organisms. (WO9821340).
- Bulthuis, B. A., Whited, G. M., Trimbur, D. E., and Gatenby, A. A. (2002). Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for vitamin B<sub>12</sub> transport. (US6432686).
- Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie - BMWi. (2007). BMWi-Energie-statistiken - Erdöl-Vorräte (sicher gewinnbar). [www.bmwi.de/BMWi/Navigation/Energie/energiestatistiken](http://www.bmwi.de/BMWi/Navigation/Energie/energiestatistiken).
- Burgard, A. P., Pahrkya, P., and Maranas, C. D. (2003). OptKnock: A bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization. *Biotechnology and Bioengineering* 85:1-11.
- BVerfG - Bundesverfassungsgericht. (2007). 1 BvR 1031/07 vom 25.7.2007 - In dem Verfahren über die Verfassungsbeschwerde gegen § 50 Abs. 1 Satz 4 und Satz 5; Abs. 3 Satz 2 und Satz 3 des Energiesteuergesetzes in der Fassung vom 15. Juli 2006 (BGBl I S. 1534), geändert durch das Gesetz zur Einführung einer Biokraftstoffquote durch Änderung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes und zur Änderung energie- und stromsteuerrechtlicher Vorschriften (Biokraftstoffquotengesetz) vom 18. Dezember 2006 (BGBl I S. 3180) .
- Byun, T., Zeng, A., and Deckwer, W. (1994). Reactor comparison and scale-up for the microaerobic production of 2,3-butanediol by *Enterobacter aerogenes* at constant oxygen transfer rate. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 11:167-175.
- CD Römpp. (1995). CD Römpp Chemie Lexikon. Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag. (Version 1.0).
- Chen, X., Zhang, D. J., Qi, W. T., Gao, S. J., Xiu, Z. L., and Xu, P. (2003a). Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63:143-146.

- Chen, X., Xiu, Z., Wang, J., Zhang, D., and Xu, P. (2003b). Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 33:386-394.
- Cheng, K. K., Liu, D. H., Sun, Y., and Liu, W. B. (2004). 1,3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. *Biotechnol.Lett.* 26:911-915.
- Cheng, K. K., Liu, H. J., and Liu, D. H. (2005). Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. *Biotechnol.Lett.* 27:19-22.
- Cho, M. H., Joen, S. I., Pyo, S. H., Mun, S., and Kim, J. H. (2006). A novel separation and purification process for 1,3-propanediol. *Process Biochemistry* 41:739-744.
- Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W., and Sanford, K. (2000). The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochimica et Biophysica Acta* 1543:434-455.
- Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E., and Dobrogosz, W. J. (1989). In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microb.Ecol.Health Dis.* 2:137-144.
- Chynoweth, E. (2006). Innovation: Corn sugar holds promise. *ICIS Chemical Business* 1:45.
- Circle, S. J., Stone, E., and Boruff, C. S. (1945). Acrolein determination by means of tryptophane. *Industrial and Engineering Chemistry* 17:259-262.
- Cooper, B. (2006). Einkaufspreis für Glycerin für die BASF. BASF AG, Ludwigshafen, Germany. (Persönliche Mitteilung).
- Corbin, D. R. and Norton, T. (2001). Process to separate 1,3-propanediol or glycerol, or a mixture thereof from a biological mixture. (WO0125178).
- Corbin, D. R. and Norton, T. (2003). Process to separate 1,3-propanediol or glycerol, or a mixture thereof from a biological mixture. (US6603048).
- Craciun, L., Benn, G., Dewing, J., Schriver, G., Peer, W., Siebenhaar, B., and Siegrist, U. (2005). Preparation of acrylic acid derivatives from alpha or beta-hydroxy carboxylic acids. (WO2005/095320)
- Doleyres, Y., Beck, P., Vollenweider, S., and Lacroix, C. (2005). Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl.Microbiol. Biotechnol.* 68:467-474.
- Duane, T. J. (2007). The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress* 26:338-348.
- Dunn-Coleman, N. S., Diaz-Torres, M., Chase, W., and Trimbur, D. E. (1998). Method for the recombinant production of 1,3-propanediol. (WO9821341).
- DuPont. (2006). The miracles of science - Sustainable growth through science. 2005 Annual Review. DuPont.
- DuPont. (2007). DuPont Tate & Lyle Bio Products begins bio-propanediol production. *Focus on Surfactants* 2007:4-5
- EBB - European Biodiesel Board. (2008). 2007 Biodiesel Production Capacity. European Biodiesel Board. <http://www.ebb-eu.org>.

- El-Ziney, M. G. (1997). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria metabolites: the role of lactic acid, enterocin 5701 and reuterin. Dissertation, University of Ghent, Belgien.
- El-Ziney, M. G., Debevere, J. M., and Jakobsen, M. (2000). Reuterin. in: Natural Food Antimicrobial Systems. London: CRC Press: 567-587.
- El-Ziney, M. G., van-den-Tempel, T., Debevere, J., and Jakobsen, M. (1999). Application of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* 12002 for meat decontamination and preservation. *J. Food Prot.* 62:257-261
- Emptage, M., Haynie, S., Laffend, L. A., Pucci, J., and Whited, G. M. (2001). Process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer. (WO0112833 A).
- Evans, C. G. T., Herbert, D., and Tempest, D. W. (1970). The continuous cultivation of microorganisms. in: Methods in Microbiology. Construction of a chemostat. London/New York: Academic Press. 2:277-327.
- Finlay, T. H., Valinsky, H., Sato, K., and Abeles, R. H. (1972). Studies on the mechanism of action of coenzyme B<sub>12</sub>. *J. Biol. Chem.* 247:4197-4207.
- Forage, R. G. and Foster, M. A. (1979). Resolution of the vitamin B<sub>12</sub>-dependent dehydratases of *Klebsiella sp.* and *Citrobacter freundii*. *Biochim. Biophys. Acta* 569:249-258.
- Forage, R. G. and Foster, M. A. (1982). Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: Functions of the coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol and diol dehydratases. *J. Bacteriol.* 149:413-419.
- Forage, R. G. and Lin, E.-C. C. (1982). dha system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J. Bacteriol.* 151:591-599.
- Frost & Sullivan. (2006). European Glycerine Markets, BA17-39.
- Gesetz für den Vorrang Erneuerbarer Energien (Erneuerbare-Energien-Gesetz, EEG vom 21. Juli 2004. *Bundesgesetzblatt I* 2004:1918.
- Gokarn, R. R., Selifonova, O. V., Jessen, H., Gort, S. J., Selmer, T., and Buckel, W. (2002). 3-Hydroxypropionic acid and other organic compounds. (WO0242418).
- Gottschalk, G. and Averhoff, B. (1990). Process for the microbial preparation of 1,3-propanediol from glycerol. (EP0373230 A1).
- Grothe, E. (2000). Konzeption und Wirtschaftlichkeit der industriellen Glycerinvergärung zu 1,3-Propanediol. Fortschritt-Berichte VDI / Biotechnik / Medizintechnik. 17.
- Günzel, B., Yonsel, S., and Deckwer, W.-D. (1991). Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m<sup>3</sup>. *Applied Microbiology and Biotechnology* V36:289-294.
- Hall, R. and Stern, E. S. (1950). Acid-catalysed hydration of acetaldehyde. Kinetics of the reaction and isolation of  $\beta$ -hydroxypropionaldehyde. *J. Chem. Soc.*:490-498.
- Hao, J., Liu, H., and Liu, D. (2005). Novel route of reactive extraction to recover 1,3-propanediol from a dilute aqueous solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44:4380-4385.
- Hao, J., Xu, F., Liu, H., and Liu, D. (2006). Downstream processing of 1,3-propanediol fermentation broth. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81:102-108.

- Hao, J., Lin, R., Zheng, Z., Liu, H., and Liu, D. (2008). Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-008-9665-y
- Hartlep, M. (2000). Wachstumsphysiologie und Prozeßoptimierung der Glycerinfermentation mit *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch Kultur. Diplomarbeit, TU Braunschweig.
- Hartlep, M. (2006). Prozessentwicklung und Metabolic Engineering der mikrobiellen Produktion von 1,3-Propandiol. Dissertation TU-Braunschweig.
- Haynie, S. and Wagner, L. W. (1996). Process for making 1,3-propanediol from carbohydrates using mixed microbial cultures. (WO9635799 A1).
- Heckmann, H., Macholdt, H. T., and Venera, M. (2005). Violet colorant for colour filters, inks for ink-jet, electrophotographic toners and developers and e-inks. (WO2005/085367)
- Held, A. M. (1996). The fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. Diplomarbeit University of Wisconsin- Madison, USA.
- Henderson, E. H. (2005). Understanding oxygen sensor performance. *Occupational Health & Safety* . 74:58, 60-63
- Hilaly, A. K. and Binder, T. P. (2001). Method of recovering 1,3-propanediol from fermentation broth. Archer Daniels Midland Company. (WO0173097 A).
- Hill, F. and Tran-Dinh, K. (1989). Verfahren zur Herstellung von Propandiol-(1,3). (DE3734764 A1).
- His, S. (2005). Biofuels in Europe. *Journal of Scientific and Industrial Research* 64:931-935.
- Holmes, J. D., Richardson, D. J., Saed, S., Evans-Gowing, R., Russell, D. A., and Sodeau, J. R. (1997). Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 143:2521-2530.
- Holtmann, D. (2005). Elektrochemisches Monitoring mikrobieller Aktivität - Grundlagen und Anwendung in der Abwasserreinigung. Dissertation(Dr.-Ing.)Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Homann, T., Tag, C., Biebl, H., Deckwer, W. D., and Schink, B. (1990). Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 33:121-126.
- Honda, S., Toraya, T., and Fukui, S. (1980). In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B<sub>12</sub>-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. *J Bacteriol* 143:1458-1465.
- Houben-Weyl. (1953). Analytik von Sauerstoff-haltigen Atomgruppen - Aldehyde und Ketone. Houben-Weyl. E. Müller, O. Bayer, H. Meerwein, and K. Ziegler. 4<sup>th</sup> Edition. Georg Thieme Verlag.
- Huang, H., Gong, C. S., and Tsao, G. T. (2002). Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology* 98-100:687-698.
- Jencks, W. P. (1959). Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarabazone Formation. *J.Am.Chem.Soc.* 81:475-4481.
- Jencks, W. P. (1994). Reaction mechanisms, catalysis, and movement. *Protein science : a publication of the Protein Society* 3:2459-2464.



- Kajiura, H., Mori, K., Tobimatsu, T., and Toraya, T. (2001). Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol.Chem.* 276:36514-36519.
- Kamachi, T., Toraya, T., and Yoshizawa, K. (2004). Catalytic roles of active-site amino acid residues of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent diol dehydratase: protonation state of histidine and pull effect of glutamate. *J Am.Chem.Soc* 126:16207-16216.
- Kamm, B. and Kamm, M. (2004). Prinzipien der Bioraffinerie. *Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie*.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K. F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., and Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue):D354-D357.
- Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., and Deckwer, W. D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J.Biotechnol.* 39:59-65.
- Kretschmann, et. al. (1993). Fermentive production of 1,3-propanediol (US5254467).
- Laffend, L. A., Nagarajan, V., and Nakamura, C. E. (1996). Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism. (WO9635796).
- Lam, K., Powell, J., and Weider, P. (1997). Process for preparing 1,3-propanediol. (WO9716250)
- Li, S. G., Tuan, V. A., Falconer, J. L., and Noble, R. D. (2002). X-type zeolite membranes: preparation, characterization, and pervaporation performance. *Microporous and Mesoporous Materials* 53:59-70.
- Li, S. G., Tuan, V. A., Falconer, J. L., and Noble, R. D. (2001a). Effects of zeolite membrane structure on the separation of 1,3-propanediol from glycerol and glucose by pervaporation. *Chemistry of Materials* 13:1865-1873.
- Li, S. G., Tuan, V. A., Falconer, J. L., and Noble, R. D. (2001b). Separation of 1,3-propanediol from aqueous solutions using pervaporation through an X-type zeolite membrane. *Ind.Eng.Chem.Res.* 40:1952-1959.
- Li, S. G., Tuan, V. A., Falconer, J. L., and Noble, R. D. (2001c). Separation of 1,3-propanediol from glycerol and glucose using a ZSM-5 zeolite membrane. *Journal of Membrane Science* 191:53-59.
- Lin, E. C., Levin, A. P., and Magasanik, B. (1960). The effect of aerobic metabolism on the inducible glycerol dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*. *J Biol.Chem.* 235:1824-1829.
- Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. (1988). Antibiotic Reuterin. (WO8808452).
- Lüthi-Peng, Q., Schärer, S., and Puhán, Z. (2002). Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 60:73-80.
- Ma, H. and Zeng, A. P. (2003). Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms. *Bioinformatics.* 19:270-277.
- Magasanik, B. and Neidhardt, F. C. (1956). The effect of glucose on the induced biosynthesis of bacterial enzymes in the presence and absence of inducing agents. *Biochim Biophys Acta* 21:324-334.

- Magasanik, B. M., Brooke, M. S., and Karibian, D. (1953). Metabolic pathways of glycerol dissimilation: A comparative study of two strains of *Aerobacter aerogenes*. *J.Bacteriol.* 66:611-619
- Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Dissertation Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Schweden.
- Malinowski, J. J. (1999). Evaluation of liquid extraction potentials for downstream separation of 1,3-propanediol. *Biotechnol.Tech.* 13:127-130.
- Malinowski, J. J. (2000). Reactive extraction for downstream separation of 1,3-propanediol. *Biotechnol.Prog.* 16:76-79.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A. J., and Berkeley, R. C. W. (1972). Methods for studying bacteriocins. *Methods in Microbiology* 7 A:315-422.
- Meng, X., Abraham, T. W., and Tsobanakis, P. (2005). Process for preparation of 1,3-propanediol. (EP1556320).
- Menzel, K., Zeng, A. P., and Deckwer, W.-D. (1997). High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb.Technol.* 20:82-86.
- Menzel, K. P. (2000). Analyse der Stoffflüsse und Metabolic Engineering der Glycerinvergärung zu 1,3-Propanediol durch *Klebsiella pneumoniae*. Dissertation, TU Braunschweig.
- Mettler-Toledo GmbH. (2000). InPro 6000 Series O<sub>2</sub> Sensors. Process Analytics. Urdorf, Switzerland.
- Michaelis, L. and Flexner, L. (1928). Das Reduktionspotential des Cystein. *Naturwissenschaften* 16:688-690.
- Mori, K., Hieda, N., Yamanishi, M., Shibata, N., and Toraya, T. (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of molecular chaperone-like diol dehydratase-reactivating factor in ADP-bound and nucleotide-free forms. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Comm.* 61:603-605.
- Mori, K., Tobimatsu, T., Hara, T., and Toraya, T. (1997a). Characterization, sequencing, and expression of the genes encoding a reactivating factor for glycerol-inactivated adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase. *J.Biol.Chem.* 272:32034-32041.
- Mori, K., Tobimatsu, T., and Toraya, T. (1997b). A protein factor is essential for in situ reactivation of glycerol-inactivated adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 61:1729-1733.
- Nagarajan, V. and Nakamura, C. E. (1996). Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing recombinant diol dehydratase.(WO9635795A1).
- Nair, R. V., Payne, M. S., Trimbur, D. E., and Valle, F. (1999). Method for the production of glycerol by recombinant organisms. (WO9928480).
- Nakamura, C. E. and Whited, G. M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr.Opin.Biotechnol* 14:454-459.
- Nef, J. U. (1904). Dissociationsvorgänge in der Glycol-Glycerinreihe. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 335:191-229.

- Neidhardt, F. C. and Magasanik, B. (1957). Effect of mixtures of substrates on the biosynthesis of inducible enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *J Bacteriol.* 73:260-263.
- NIST Chemistry Webbook. (2000). 2-Propenal - Acrolein. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- Noparatnaraporn, N., Sasaki, K., Nishizawa, Y., and Nagai, S. (1986). Stimulation of vitamin B<sub>12</sub> formation in aerobically-grown *Rhodopseudomonas gelatinosa* under microaerobic condition. *Biotechnol.Lett.* 8:491-496.
- Nordhoff, H. H. (2007). Nachwachsende Rohstoffe in der chemischen Industrie - Weg vom Öl? *Chemie Ingenieur Technik* 79:551-560.
- Ogata, Y., Kawasaki, A., and Yokoi, K. (1972). Kinetics of the Condensation of Acetaldehyde with Formaldehyde in Aqueous Alkaline Solutions at 5-20°C. *Biochemistry* 11:1013-1020.
- Ohlrogge, K. (1992). Herstellung von Pervaporationsmembranen zur Abtrennung von Alkoholen/Diolen aus Fermentationsbrühen. Diplomarbeit TU-Braunschweig.
- Orsi, B. A. and Cleland, W. W. (1972). Inhibition and Kinetic Mechanism of Rabbit Muscle Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *Biochemistry* 11:102-109.
- Pflugmacher, U. and Gottschalk, G. (1994). Development of an immobilized cell reactor for the production of 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* V41:313-316.
- Pollert, G. (2007). Angaben über den Glycerinpreis. VERBIO Vereinigte BioEnergie AG. (Persönliche Mitteilung)
- Poznanskay A.A., Yakusheva M.I., and Yakovlev V.A. (1977). Study of the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and its analogs. *Biochim Biophys Acta* 484:236-243.
- Poznsanskaya, A. A. and Yakusheva, M. I. Y. V. A. (1979). Study on the mechanism of action of adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase from *Aerobacter areogenes*: II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylcobalamin and it's analogs. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 194:379-386.
- Poznsanskaya, A. A., Yakusheva, M. I., and Yakovlev, V. A. (1977). Study of the mechanism of action of adenosylcobalamindependent glycerol dehydratase from *Aerobacter aerogenes*. II. The inactivation kinetics of glycerol dehydratase complexes with adenosylobalamin and its analogs. *Biochim Biophys Acta* 484:236-243.
- Rada, A., Klancik, L., Hajek, K., and Kitzler, J. (1986). Alkyd resins with increased elasticity. *Czech CS* 236:433.
- Rat für Nachhaltige Entwicklung. (2008). Schutz der Biodiversität heißt aktuell: Biomasse-Produktion nachhaltig machen.
- Rathway, N. J. (1989). Merck-Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Merck & Co. Inc. 11 (Nr. 8588).
- Raynaud, C., Sarçabal, P., Meynial-Salles, I., Croux, C., and Soucaille, P. (2003). Molecular characterization of the 1,3-propanediol (1,3-PD) operon of *Clostridium butyricum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5010-5015.

- Read, R. R. (1941).  $\beta$ -Hydroxypropionic acid. *Org Synth Collective Volume 1* p.321 (1941):Annual Volume 4 p. 35 (1972).
- Reimann, A. and Biebl, H. (1996). Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture: Feeding strategy for glycerol and ammonium. *Biotechnol.Lett.* V18:827-832.
- Rettet den Regenwald e.V. (2008). Stoppt den Agrarenergie-Wahn! <http://www.regenwald.org/pdf/Agrarenergie.pdf>
- Richtlinie 2003/30/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Förderung der Verwendung von Biokraftstoffen oder anderen erneuerbaren Kraftstoffen im Verkehrssektor vom 8. Mai 2003. *Amtsblatt der Europäischen Union* 123:42-46.
- Ropuszynski, S. and Matyschok, H. (1966). *Chemical Abstracts* 64:3340.
- Rottig, W., Tummes, H., Cornils, B., and Weber, J. (1978). Process for the production of divalent alcohols. Ruhrchemie AG. Deutschland: (US4094914).
- Roturier, J. M., Fouache, C., and Berghmans, E. (2002). Process for the purification of 1,3-propanediol from a fermentation medium. (US6428992).
- Ruch, F. E. and Lin, E. C. C. (1975). Independent Constitutive Expression of the Aerobic and Anaerobic Pathways of Glycerol Catabolism in *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 124:348-352.
- Sachverständigenrat für Umweltfragen. (2007). Klimaschutz durch Biomasse - Sondergutachten. Berlin:Erich Schmidt Verlag GmbH & Co.
- Sanz, M. T., Blanco, B., Beltran, S., Cabezas, J. L., and Coca, J. (2001). Vapor liquid equilibria of binary and ternary systems with water, 1,3-propanediol, and glycerol. *Journal of Chemical and Engineering Data* 46:635-639.
- Sarcabal, P., Croux C., and Soucaille P. (2001). Method for preparing 1,3-propanediol by a recombinant micro-organism in the absence of coenzyme B<sub>12</sub> or one of its precursors. (WO0104324).
- Schlieker, H., Guenzel, B., Deckwer, W. D., Solomon, B. O., Zeng, A. P., Biebl, H., and Posten, C. (1992). Use of adsorption for product separation in the fermentation of glycerol to 1,3-propanediol. Comparison of the energetic efficiencies of hydrogen and oxychemicals formation in *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* during anaerobic growth on glycerol. *Chem.Eng.Tech.* 64:727-728.
- Schneider, Z. and Pawelkiewicz. (1966). The properties of glycerol dehydratase isolated from *Aerobacter aerogenes*, and the properties of the apoenzyme subunits. *J.Acta Biochim.Polon.* 13:311-328
- Schneider, Z., Larsen, E. G., Jacobson, G., Johnson, B. C., and Pawelkiewicz, J. (1970). Purification and properties of glycerol dehydrase. *Journal of Biological Chemistry* 245:3388-3396.
- Schomburg, I., Chang, A., Ebeling, C., Gremse, M., Heldt, C., Huhn, G., and Schomburg, D. (2004). BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Res.* 32(Database issue):D431-D433.
- Schuler, P. (1987). Oxi-Fibel. Einführung in die Gelöstsauerstoff-Meßtechnik. WTW, Weilheim.
- Schütz, Z. and Radler, F. (1984). Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Appl.Microbiol.* 5:169-178.

- Shibata, N., Masuda, J., Morimoto, Y., Yasuoka, N., and Toraya, T. (2002). Substrate-induced conformational change of a coenzyme B<sub>12</sub>-dependent enzyme: crystal structure of the substrate-free form of diol dehydratase. *Biochemistry* 41:12607-12617
- Shibata, N., Mori, K., Hieda, N., Higuchi, Y., Yamanishi, M., and Toraya, T. (2005). Release of a damaged cofactor from a coenzyme B<sub>12</sub>-dependent enzyme: X-ray structures of diol dehydratase-reactivating factor. *Structure*. 13:1745-1754.
- Sims, B. (2007). Biodiesel: A Global Perspective. *Biodiesel Magazine*. 12.  
<http://biodieselmagazine.com>
- Slininger, P. J. and Bothast, R. J. (1985). Optimizing aerobic conversion of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde. *Appl.Environ.Microbiol.* 50:1444-1450.
- Slininger, P. J. and Bothast, R. J. (1990). Rapid and high yield production of 3-hydroxypropionaldehyde. (US4962027).
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., and Smiley, K. L. (1983). Production of 3-hydroxypropion-aldehyde from glycerol. *Appl.Environ.Microbiol.* 46:62-67.
- Sobolov, M. and Smiley, K. L. (1960). Metabolism of Glycerol by an Acrolein-Forming Lactobacillus. *J.Bacteriol.* 79:261-266.
- Spiegel Online. (2008). Euro steigt über 1,50 Dollar - Ölpreis auf Rekord. *Spiegel Online* .  
<http://www.spiegel.de/wirtschaft/0,1518,538038,00.html>
- Streekstra, H., Teixeira-de-Mattos, M. J., Neijssel, O. M., and Tempest, D. W. (1987). Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. *Arch.Microbiol.* 147:268-275.
- Sun, J., van den, H. J., Soucaille, P., Qu, Y., and Zeng, A. P. (2003). Comparative genomic analysis of dha regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. *Biotechnol Prog* 19(2):263-272.
- Sung, H.-W., Chen, C.-N., Chang, Y., and Liang, H.-F. (2002). Biocompatibility study of biological tissues fixed by a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri*. *Biomaterials* 23:3203-3214.
- Sung, H.-W., Chen, C.-N., Liang, H.-F., and Hong, M.-H. (2003). A natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* for biological-tissue fixation. *Biomaterials* 24:1355-1347.
- Suthers, P. and Cameron, D. C. (2001). Production of 3-Hydroxypropionic acid in recombinant organisms. (WO2001/16346).
- Tag, C. (1990). Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol.Dissertation Universität Oldenburg.
- Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., and Dobrogosz, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob.Agents Chemother.* 32:1854-1858.
- Technical Advisory Committee Biomass R&D. (2002). Vision for bioenergy & biobased products in the United States.Washington D.C.
- Thannhauser, T. W., Konishi, Y., and Scheraga, H. A. (1984). Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Anal.Biochem.* 138:181-188.

- Thannhauser, T. W., Konishi, Y., and Scheraga, H. A. (1987). Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins. *Methods Enzymol.* 143:115-119.
- Tobimatsu, T., Kajiura, H., and Toraya, T. (2000). Specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Arch.Microbiol.* 174:81-88.
- Tobimatsu, T., Kajiura, H., Yunoki, M., Azuma, M., and Toraya, T. (1999). Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Bacteriol.* 181:4110-4113.
- Toraya, T. (2000). Radical catalysis of B<sub>12</sub> enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cell Mol.Life Sci.* 57:106-127.
- Toraya, T. and Fukui, S. (1977). immunochemical evidence for the difference between coenzyme-B<sub>12</sub>-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Eur.J.Biochem.* 76:285-289.
- Toraya, T. and Fukui, S. (1980). The synthesis of several immobilized derivatives of vitamin B<sub>12</sub> coenzyme and their use as affinity adsorbents for a study of interactions of diol dehydrase with the coenzyme. *J Bacteriol* 255:3520-3525.
- Toraya, T., Honda, S., Kuno, S., and Fukui, S. (1978). Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent diol dehydratase: regulation of apoenzyme synthesis in *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) ATCC 8724. *J Bacteriol* 135:726-729.
- Toraya, T., Shirakashi, T., Kosuga, T., and Fukui, S. (1976). Substrat specificity of coenzyme B<sub>12</sub> dependent diol dehydratase: glycerol as both a good substrate and a protein inactivator. *Biochem.im.biophys.Res.Comm.* 69:475-480.
- Trimbur, D. E., Whited, G. M., and Selfinova, O. V. (2000). Mutant 1,3-propanediol dehydrogenase. (WO0070057).
- Tsobanakis, P., Meng, X., and Abraham, T. W. (2005). Methods of manufacturing derivatives of beta-hydroxycarboxylic acids. (US20050221457).
- UFOP - Union zur Förderung von Oel- und Proteinpflanzen e.V. (2007). Biodiesel & Co. Auszüge aus dem UFOP-Bericht 2006/2007. [www.ufop.de](http://www.ufop.de).
- Ullmann. (1993). Propanediols. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. G. Schulz, S. Hawkins, B. Elvers, and M. Ravenscroft. VCH Publishers, Inc. 5. A22:163-171.
- Ulmer, C. and Zeng, A. P. (2007). Microbial production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol bioconversion. *Chem.Biochem.Eng.Q.* 21:321-326.
- Ushio, K., Honda, S., Toraya, T., and Fukui, S. (1982). The mechanism of in situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme B<sub>12</sub>-dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.* 28:225-236.
- van Haveren, J. and Elinor, L. S. (2008). Bulk chemicals from biomass. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2:41-57.
- Vancauwenberge, J. E., Slininger, P. J., and Bothast, R. J. (1990). Bacterial conversion of glycerol to beta-hydroxypropionaldehyde. *Appl.Environ.Microbiol.* 56:329-332.
- VDB - Verband der Deutschen Biokraftstoffindustrie e. V (2007). Jahresbericht 2006/2007. [www.biokraftstoffverband.de](http://www.biokraftstoffverband.de)

- Vollenweider, S., Grassi, G., König, I., and Puhon, Z. (2003). purification and structural characterization of 3-hydroxypropionaldehyde and its derivatives. *J.Agric.Food Chem.* 51:3287-3293.
- Vollenweider, S. and Lacroix, C. (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:16-27.
- Wang, W., Sun, J., Hartlep, M., Deckwer, W.-D., and Zeng, A. P. (2003). Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioengineering* 83:525-536.
- Weast, R. C. (1990). CRC Handbook of Chemistry and Physics. 70<sup>th</sup> Edition. Boca Raton: CRC Press.
- Whited, G. M., Bulthuis, B., Trimbur, D. E., and Gatenby, A. A. (1999). Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for vitamin B<sub>12</sub> transport. (WO99/58686 A2).
- Wilkins, A. E. L. D. J. (2004). Product removal process for use in a biofermentation system. (US6812000).
- Wissenschaftlicher Beirat Agrarpolitik beim Bundesministerium für Ernährung (2007). Nutzung von Biomasse zur Energiegewinnung - Empfehlungen an die Politik.
- Witt, U., Müller, R.-J., Augusta, J., Widdecke, H., and Deckwer, W.-D. (1994). Synthesis, properties and biodegradability of polyeesters based on 1,3- propanediol. *Macromol.Chem. Pys.* 195:793-802.
- Xiang, B., Chen, S., and Liu, D. (2001). Extraction of 1, 3-propanediol in dilute fermentation broth. *Qinghua Daxue Xuebao/Journal of Tsinghua University* 41:53-55.
- Xiu, Z. L. and Zeng, A. P. (2008). Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:917-926.
- Yunmbam, M. K. and Roberts, J. F. (1993). In vivo evaluation of reuterin and its combinations with suramin, melarsoprol, DL-alpha-difluoromethylornithine and bleomycin in mice infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Comp.Biochem.Physiol.* 105:521-524.
- Zeng, A. P. and Deckwer, W. D. (1992). Utilization of the tricarboxylic acid cycle, a reactor design criterion for the microaerobic production of 2,3-butanediol. *Biotechnology and Bioengineering* 40:1078-1084.
- Zeng, A. P., Biebl, H., Schlieker, H., and Deckwer, W. D. (1993). Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microb.Technol.* 15:770-779.
- Zeng, A. P., Ross, A., Biebl, H., Tag, C., Gunzel, B., and Deckwer, W. D. (1994a). Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 44:902-911.
- Zeng, A. P., Byun, T. G., Posten, C., and Deckwer, W. D. (1994b). Use of respiratory quotient as a control parameter for optimum oxygen supply and scale-up of 2,3-butanediol production under microaerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 44:1107-1114.
- Zheng, P., Wereath, K., Sun, J., van den Heuvel, J., and Zeng, A. P. (2006). Overexpression of genes of the dha regulon and its effects on cell growth, glycerol fermentation to 1,3-propanediol and plasmid stability in *Klebsiella pneumoniae*. *Process Biochemistry* 41:2160-2169.

Zheng, Z. M., Cheng, K. K., Hu, Q. L., Liu, H. J., Guo, N. N., and Liu, D. H. (2008b). Effect of culture conditions on 3-hydroxypropionaldehyde detoxification in 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal* 39:305-310.

Zhu, M. M., Lawman, P. D., and Cameron, D. C. (2002). Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate. *Biotechnology Progress* 18:694-699.



---

## 7 ANHANG:

### ***PROBLEMATIK DER SCHEINBAREN ERHÖHUNG DES $pO_2$ -WERTS***

---

Das Problem der scheinbaren Erhöhung des  $pO_2$ -Werts trat im Zusammenhang mit der  $pO_2$ -Messung mittels Clark-Elektroden bei der mikroaerophilen Fermentation auf und wurde zuerst als Messfehler betrachtet, nach wiederholter Versuchsdurchführung unter gleichen Bedingungen wurde jedoch klar, dass es sich um ein systembedingtes Phänomen handeln musste, dass eine eingehendere Untersuchung verdient.

#### **7.1 BESCHREIBUNG DES PHÄNOMENS**

Bei der im Folgenden beschriebenen mikroaeroben Fermentation von Glycerin durch *K. pneumoniae* sollte die  $pO_2$ -Konzentration auf 3 % Luftsättigung geregelt werden. Der  $pO_2$ -Wert wurde dabei mit einer Clark-Sauerstoffelektrode gemessen und die Sauerstoffregelung erfolgte mittels des Prozessleitsystems UBICON mit einem PI-Regler mit  $K_p$ : 0,001 und  $K_i$ : 0,00015 (Abbildung 7.1). Ab Stunde 0,7 war der angezeigte  $pO_2$ -Wert bereits zu hoch, weshalb die Luftzufuhr abgestellt wurde. Im weiteren Verlauf stieg der  $pO_2$ -Wert sogar bis zu einer  $pO_2$ -Konzentration von 10 % Luftsättigung an, obwohl kein Sauerstoff mehr zugeführt wurde. Der faseroptische Sauerstoffsensor MOPS zeigte demgegenüber einen konstanten  $pO_2$ -Wert von 2 % Luftsättigung an. Man würde sagen, die Elektrode driftet. Dies ist jedoch keine Drift im engeren Sinne, da der angezeigte  $pO_2$ -Wert nun parallel zum  $CO_2$ -Wert verläuft, was hier als scheinbarer  $pO_2$ -Wert definiert werden soll.

Die Clark-Elektrode wurde aus dem Fermenter ausgebaut, in 0,5 M  $K_2PO_4$ , pH 7 getaucht und mit Stickstoff begast. Es konnte ein Nullpunkt von 0,8 % Sauerstoffsättigung ermittelt werden. Beim Wiedereinbau in den Reaktor zeigte diese Elektrode einen scheinbaren  $pO_2$ -Wert von 7,8 % Luftsättigung an (nicht gezeigt).

Nach Wiedereinbau in den Fermenter wurde nach 1,5 h für 1 h lang mit  $CO_2$  begast (Abbildung 7.2). Die Abbildung zeigt, dass der scheinbar erhöhte  $pO_2$ -Wert nicht auf eine gesteigerte physiologische Aktivität der Zellmasse zurückzuführen ist, worauf ein hoher  $CO_2$ -Wert auch hindeuten könnte, sondern tatsächlich auf die  $CO_2$ -Konzentration im Reaktor: Die Bega-

sung mit 5 %  $\text{CO}_2$  führt zu einer Erhöhung des scheinbaren  $\text{pO}_2$ -Werts bis zu 12,5 % Luftsättigung.

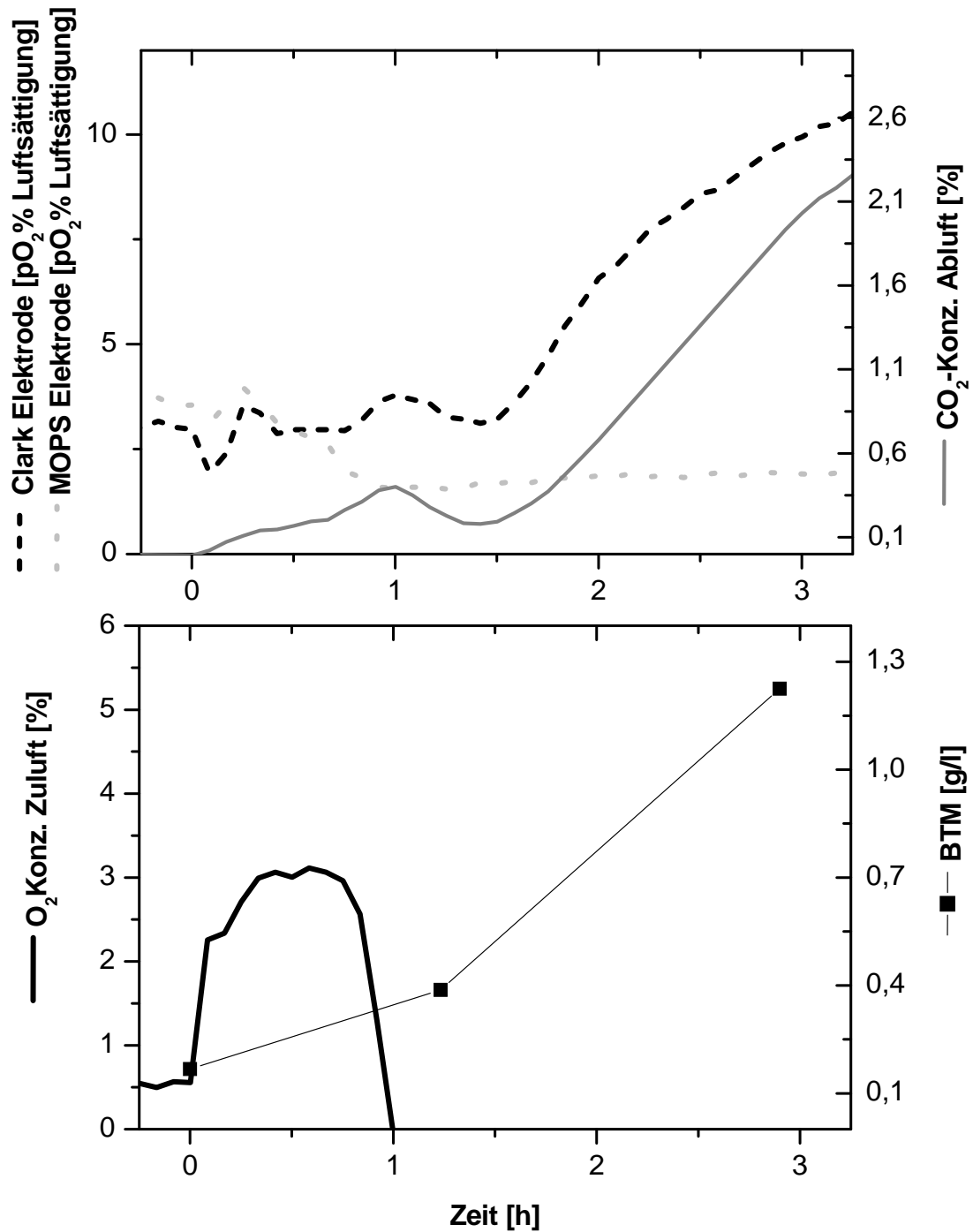


Abbildung 7.1:  $\text{pO}_2$ -Messung in einer mikroaeroben Fermentation. Regelung auf 3 % Luftsättigung.

Im zellfreien System konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden: Nach Neukalibrierung der Elektrode wurde das Reaktionsverhalten gegenüber 10 %  $\text{CO}_2$  in 0,5 M  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 7 getestet und es zeigte sich nur eine vernachlässigbare Reaktion von 0,6 % Luftsättigung.

Die Elektrode wurde nach dem Ausbau aus dem Reaktor wiederum in 0,5 M  $\text{K}_2\text{PO}_4$  getaucht und mit Stickstoff unter Rühren begast, der scheinbare  $\text{pO}_2$ -Wert fällt von 6 % in 1,5 h auf 0,6 %. Dies kann z.B. mit einem Abwaschen einer Foulingschicht von der Oberfläche der Elektrode oder mit einer Verdünnung einer die  $\text{pO}_2$ -Messung störenden Substanz erklärt werden.

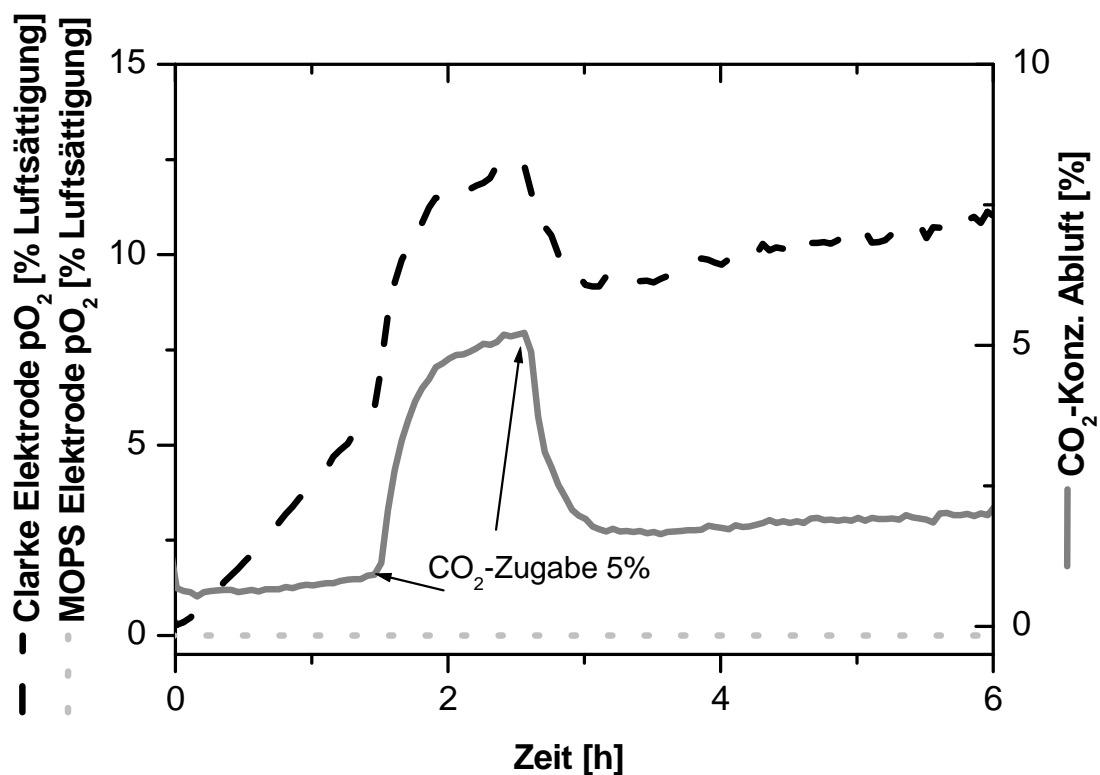


Abbildung 7.2: Reaktion der Clark-Elektrode auf 5 %  $\text{CO}_2$ -Zugabe in der Fermentationsbrühe.

Die Untersuchungen zeigen, dass es sich nicht nur um einen reinen Einfluss der  $\text{CO}_2$ -Konzentration handeln kann, da sich bei der Exposition einer neubelegten Clark-Elektrode mit  $\text{CO}_2$  keine Störung zeigt, sondern nur nach Exposition der Clark-Elektrode mit Fermentationsbrühe von *K. pneumoniae*.

## 7.2 CYSTEIN ALS VERSTÄRKENDE SUBSTANZ DES SCHEINBAREN $pO_2$ -WERTS

In der Literatur wird von Störungen bei der  $pO_2$ -Messung mit Clark-Elektroden in Brauereibrühen berichtet, d.h. bei permanent niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in Gegenwart von sauren, flüchtigen Komponenten wie z.B.  $CO_2$  (Mettler-Toledo GmbH, 2000; Henderson, 2005), allerdings wird hier eine  $CO_2$ -Konzentration mehr als 25 % angegeben. Die Pufferkapazität der Elektrolytlösung im Sensor ist dann nicht ausreichend. Der pH-Wert verschiebt sich ins Saure und das Messgerät zeigt zu hohe Messwerte an. In dem beschriebenen Fall kann nicht von einer längeren Exposition der Elektrode bei hohen  $CO_2$ -Werten gesprochen werden, da bereits nach ca. 2 h eine scheinbare Erhöhung des  $pO_2$ -Werts auftrat.

Weiterhin kann die Bildung von  $H_2S$  die  $pO_2$ -Messung stören, da durch die Membran diffundierendes  $H_2S$  die Gegenelektroden vergiftet (Schuler, 1987). Es bildet sich Silbersulfid, die Elektrode wird schwarz.

Eine mögliche Substanz, die eine Störung des  $pO_2$ -Werts verursachen könnte, ist auch Cystein, das im Hefeextrakt enthalten ist und somit in der Fermentationsbrühe vorliegt. Cystein wirkt stark reduzierend und kann als Redoxsystem wirken. Die Thiol-Gruppen ( $SH-$ ) des Cysteins können elektrochemisch zu Cystin oxidiert werden und damit ein Stromsignal an Elektroden wie z.B. Redoxelektroden verursachen (Holtmann, 2005; Michaelis und Flexner, 1928).

Um dies zu überprüfen, wurde die Elektrode nach dem Ausbau aus dem Reaktor wiederum in 0,5 M  $K_2PO_4$  getaucht und mit Stickstoff unter Rühren begast. Es erfolgte eine Zugabe von Cystein zum Zeitpunkt Null (Abbildung 7.3) mit einer Konzentration von 1,65 mM, die den physiologischen Bedingungen entspricht (Hartlep, 2006). Dies verursachte einen moderaten scheinbaren  $pO_2$ -Wert von 6 %. Mischt man jedoch dem zugeführten Gas 10 %  $CO_2$  bei, ergibt sich ein scheinbarer  $pO_2$ -Wert von 50 %. Dieser  $CO_2$ -Effekt fällt im Laufe der Zeit ab. Durch die Begasung mit reinem Stickstoff kann der  $CO_2$ -Effekt rückgängig gemacht werden und der scheinbare  $pO_2$ -Wert fällt wieder auf den Ausgangswert des Cystein-Effekts von 6 % zurück (Abbildung 7.3).

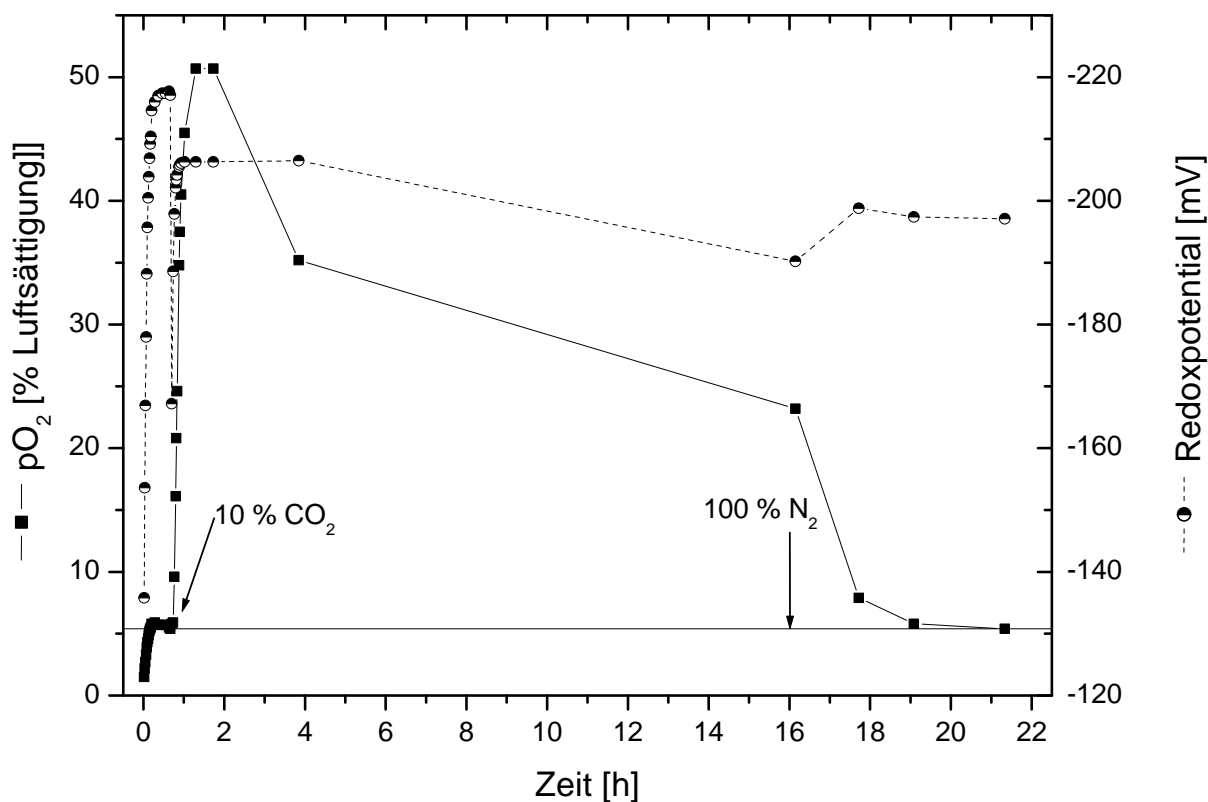


Abbildung 7.3: Reaktion der Clark-Elektrode in Cystein-Phosphatpuffer auf 10 %  $\text{CO}_2$ .

Betrachtet man das Verhalten von scheinbarem  $\text{pO}_2$ -Wert und Redoxpotential bei der Zugabe von Cystein genauer, ist ein Zusammenhang zwischen der Verringerung des Redoxpotentials und dem Anstieg des scheinbaren  $\text{pO}_2$ -Werts zu erkennen (Abbildung 7.4). Dieser Zusammenhang kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$y(x) = -270,6 + 184,2 \cdot e^{(-x/4,8)} \quad \text{Gl. 7.1}$$

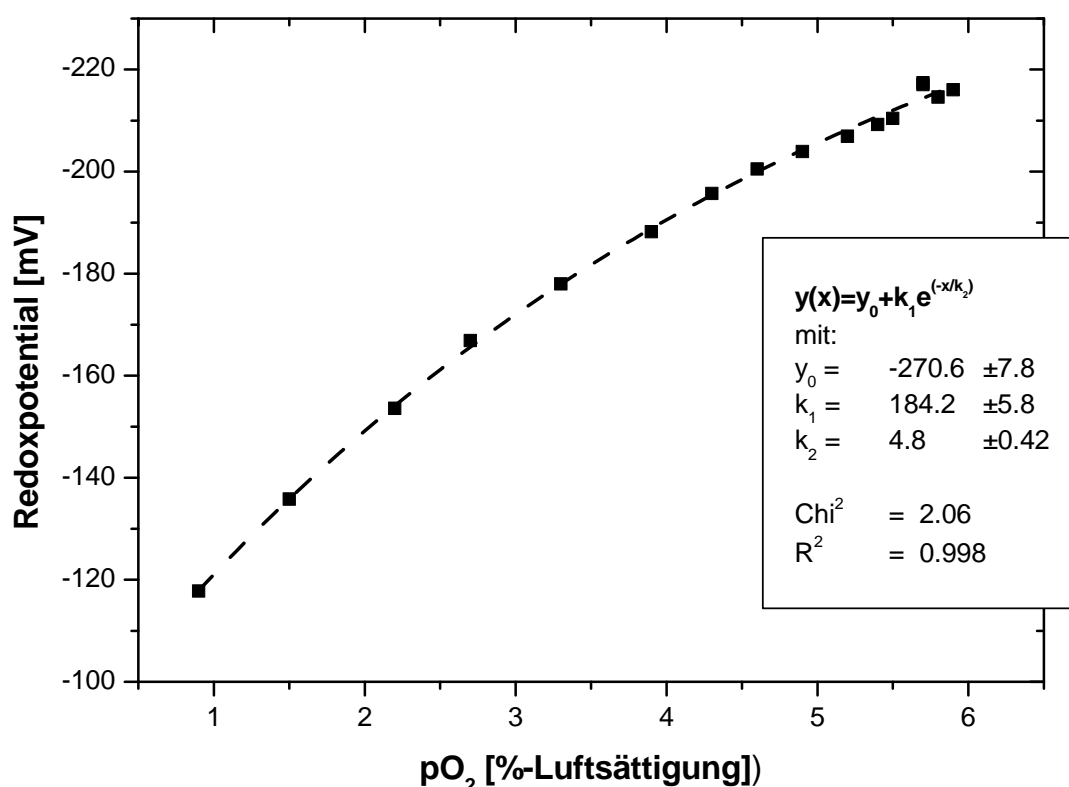


Abbildung 7.4: Zusammenhang zwischen scheinbarem  $pO_2$ -Wert und dem Redoxpotential bei Zugabe von Cystein.

Wiederholt man den Versuch mit einer neu belegten und neu kalibrierten Elektrode (0,5 M  $K_2PO_4$ -Puffer, Zugabe von 1,65 mM Cystein unter Stickstoffbegasung) zeigt sich ein anderes Verhalten, die Elektrode zeigte keine Reaktion auf Cystein, jedoch ein moderates Verhalten auf Cystein und  $CO_2$ , wobei sich durch die Steigerung der  $CO_2$ -Konzentration von 2,5 % auf 5 % kein größerer scheinbarer  $pO_2$ -Wert ergibt (Abbildung 7.5).

Wiederholt man den Versuch nur mit Phosphatpuffer (0,5 M  $K_2PO_4$ -Puffer) ohne Cysteinzugabe und begast die Elektrode mit 5 %  $CO_2$  gibt die Elektrode keine Reaktion.

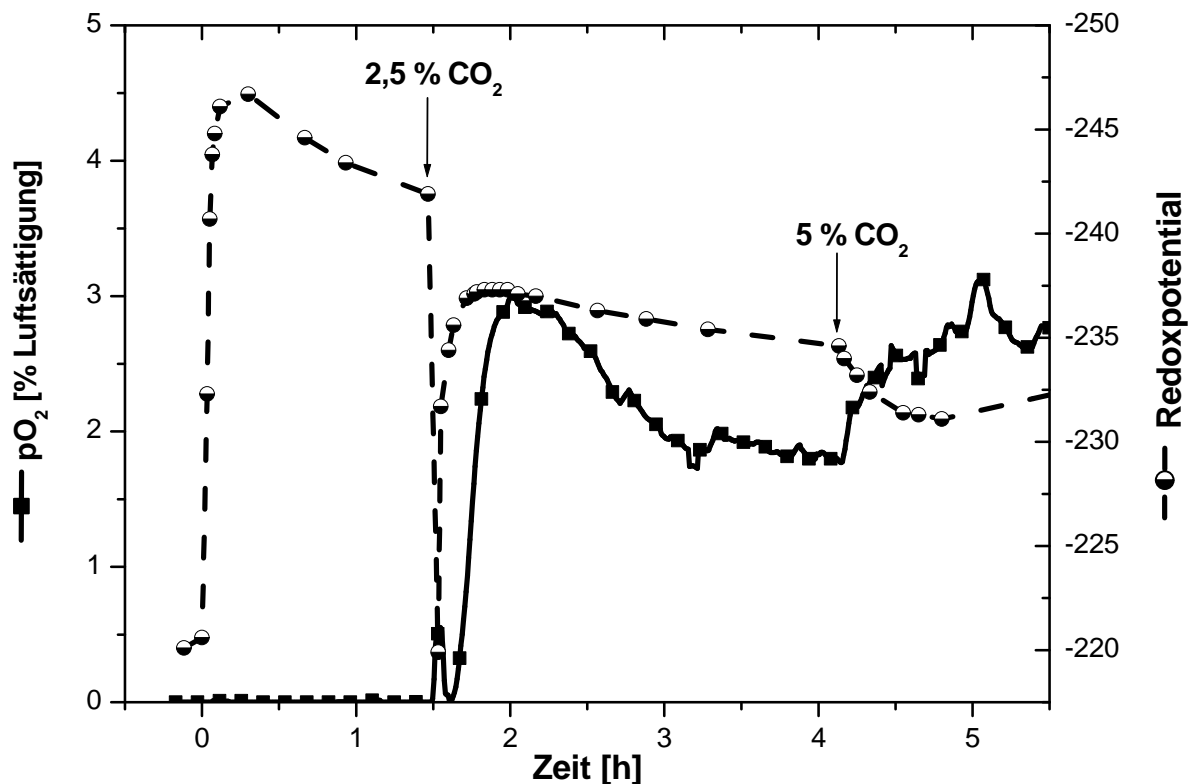


Abbildung 7.5: Reaktion der neu belegten Clark-Elektrode in Cystein-Phosphatpuffer auf 2,5 %  $\text{CO}_2$ - bzw. 5 %  $\text{CO}_2$ -Zugabe. Begasung mit Stickstoff.

Es ergeben sich folgende Aspekte:

- Erfolgt eine Exposition einer Clark-Elektrode mit Fermentationsbrühe von *K. pneumoniae*, reagiert diese in Gegenwart von Cystein und  $\text{CO}_2$  mit einem scheinbaren  $\text{pO}_2$ -Wert von bis zu 50 %. Es kann ein hyperbolischer Zusammenhang zwischen dem Redoxpotential und dem scheinbarem  $\text{pO}_2$ -Wert bei Zugabe von Cystein festgestellt werden.
- Eine neu belegte Elektrode reagiert in Pufferlösung nicht auf Cystein allein, jedoch auf Cystein und  $\text{CO}_2$ , allerdings nur mit einem moderaten scheinbaren  $\text{pO}_2$ -Wert von 3 %.

Somit kann festgestellt werden, dass sich in der Fermentationsbrühe von *K. pneumoniae* eine Substanz befinden muss, die die Elektrode für Cystein, bzw.  $\text{CO}_2$  sensitiviert. Cystein ist auf jeden Fall für einen Teil des Effektes verantwortlich, da ohne Cystein keine Reaktion der Clark-Elektrode auf  $\text{CO}_2$  erfolgt.

Es ist bekannt, dass einige *Escherichia*- und *Klebsiella*-Arten sowie *Clostridien* eine Cystein-Desulphhydrase-Aktivität aufweisen (Holmes *et al.*, 1997; Awano *et al.*, 2005; Barrett und Clark, 1987), d.h. Cystein kann in Pyruvat, Ammonium und H<sub>2</sub>S gespalten werden. Eigentlich wird durch die Einwirkung von H<sub>2</sub>S das Ansprechverhalten der Elektrode träge und zeigt keine zu hohen Messwerte an. H<sub>2</sub>S könnte aber die Pufferkapazität der Elektrode soweit herabsetzen und damit die Elektrode soweit sensitivieren, dass das entstehende CO<sub>2</sub> einen weitaus höheren Effekt auslöst, als dies ohne Cystein der Fall wäre.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Cystein einen positiven Effekt bei der Glycerinfermentation von *K. pneumoniae* und *C. butyricum* hat (Hartlep, 2006). Der Wirkungsmechanismus dieses Effekts ist jedoch nicht bekannt.

### 7.3 ANAEROBE FERMENTATIONEN ZUR BESTIMMUNG DES SCHEINBAREN pO<sub>2</sub>-WERTS

Um weitere Informationen zur Entstehung des scheinbaren pO<sub>2</sub>-Werts zu erhalten, wurden in anaeroben Fermentationen der scheinbare pO<sub>2</sub>-Wert und das Redoxpotential bestimmt, sowie der Cysteingehalt gemessen.

Die erste Fermentation, eine Fed-Batch-Kultur, sollte klären, ob der scheinbare pO<sub>2</sub>-Wert vom benutzten Substrat abhängig ist. Da der scheinbare pO<sub>2</sub>-Wert zuerst bei Glycerinfermentationen beobachtet wurde, wurde hier Glucose als Substrat verwendet und zusammen mit Hefeextrakt zugefüttert (Abbildung 7.6). Auch hier trat das Phänomen des scheinbaren pO<sub>2</sub>-Werts auf. So wurde eine scheinbare Konzentration von 15 % Luftsättigung beobachtet. Bei dieser Fermentation wurde der Cysteingehalt zum einen aus dem Hefeextrakt-Gehalt des Mediums und der Hefeextraktzufütterung errechnet (theoretischer Cysteinwert in Abbildung 7.6), zum anderen nach Thannhauser *et al.* (1987) direkt gemessen. Es zeigte sich, dass in der Kultur kein Cystein verbraucht wurde.



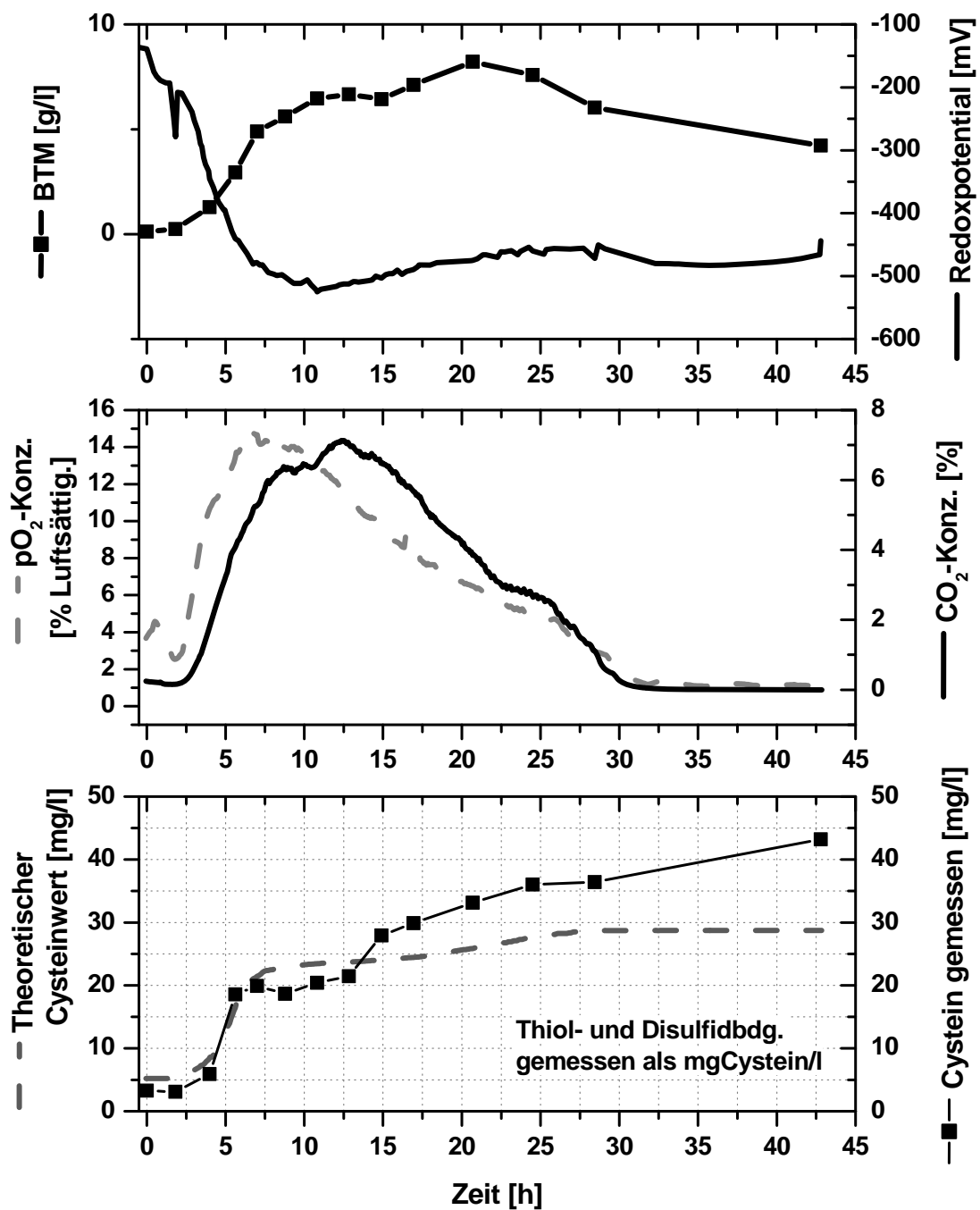


Abbildung 7.6: Anaerobe Fermentation mit *K. pneumoniae* mit Glucose als Substrat zur Bestimmung des scheinbaren pO<sub>2</sub>-Werts.

Die zweite Fermentation (Abbildung 7.7) sollte klären, ob das Problem des scheinbaren pO<sub>2</sub>-Werts auf *K. pneumoniae* beschränkt oder ein Phänomen aller Fermentationen mit Zufütterung von Hefeextrakt als Quelle des Cysteins ist. Hierzu wurde eine anaerobe Fermentation

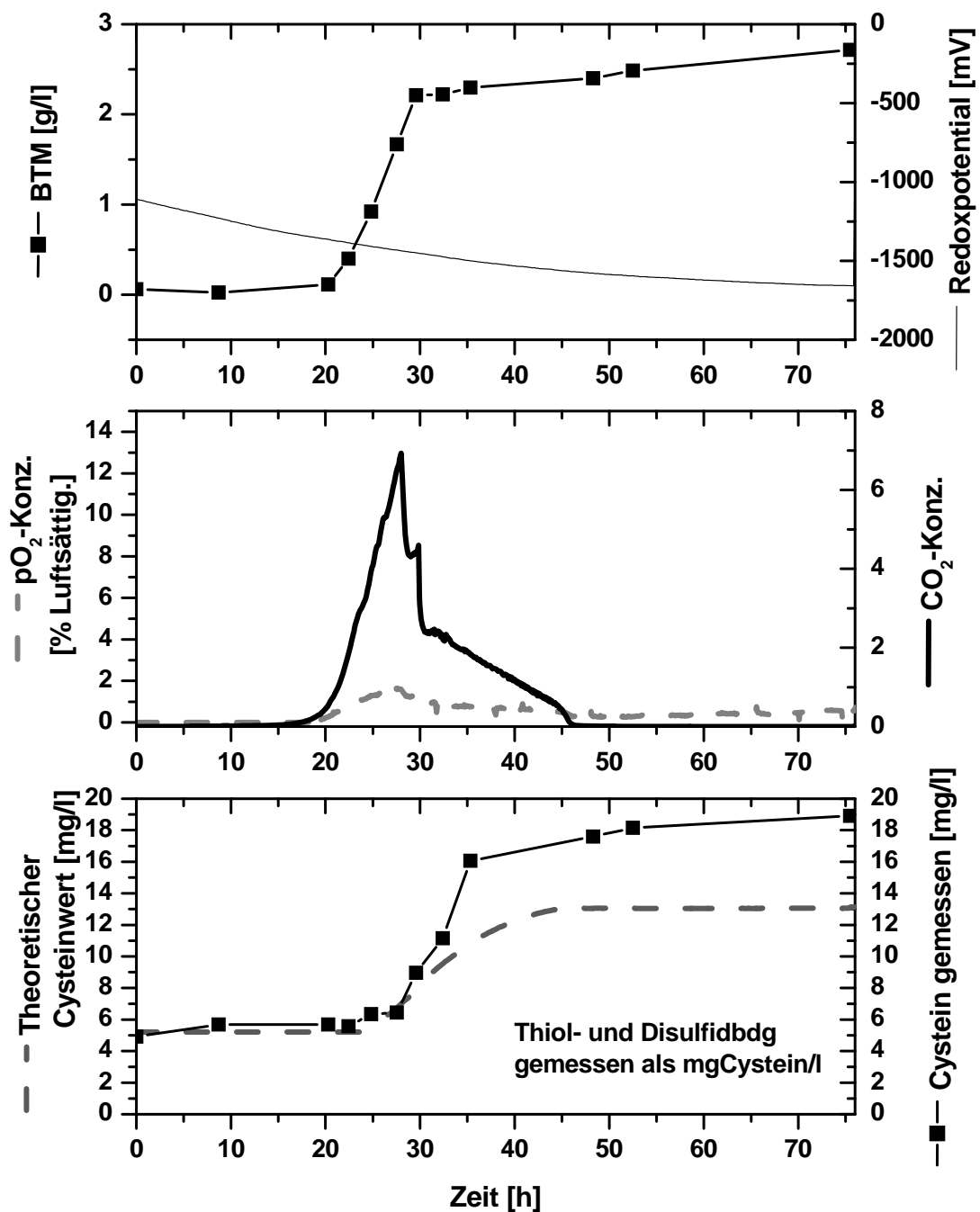


Abbildung 7.7 Anaerobe Fermentation von *C. butyricum* mit Glycerin als Substrat zur Bestimmung des scheinbaren pO<sub>2</sub>-Werts.

mit *C. butyricum* mit Glycerin als Substrat durchgeführt. Es zeigte sich, dass sich ein mit 2 % weitaus geringerer scheinbarer pO<sub>2</sub>-Wert einstellt als bei *K. pneumoniae* mit 15 %, obwohl die Cystein- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen ungefähr vergleichbar sind. Dieses Verhalten ent-

spricht dem einer neubelegten Elektrode in Gegenwart von Cystein und CO<sub>2</sub> (Kapitel 7.2). Die Fermentationsbrühe hat hier also praktisch keinen Einfluss.

#### **7.4 FAZIT**

Das Phänomen des scheinbaren pO<sub>2</sub>-Werts tritt vor allem bei Fermentationen mit *K. pneumoniae* auf, hier wird die Clark-Elektrode sensitiviert und abhängig von der CO<sub>2</sub>-Konzentration wird in Abwesenheit von Sauerstoff ein scheinbarer pO<sub>2</sub>-Wert angezeigt. Cystein als Bestandteil von zugefüttertem Hefeextrakt ist verantwortlich für einen Teil des Effektes, denn ohne Cystein tritt keine Beeinträchtigung der Clark-Elektrode durch CO<sub>2</sub> auf. Bei Fermentationen mit *C. butyricum* erscheint dieses Phänomen in weitaus geringerem Ausmaß. Die Frage nach der gesteigerten Cystein-Desulfhydrase-Aktivität konnte nicht vollständig geklärt werden, da die Fermentation mit *C. butyricum* keine erhöhten Messwerte in der pO<sub>2</sub>-Messung aufzeigte.